



WIRKUNG VON INSULIN AUF DIE MIKROVASKULÄRE ENDOTHELIALE BARRIEREFUNKTION

JOHANNES THOM

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Zahnmedizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2010

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2010

© 2010 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Wirkung von Insulin auf die mikrovaskuläre endotheliale Barrierenfunktion

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität
Gießen

vorgelegt von Johannes Stefan Thom
aus Rastatt

Gießen 2010

Aus dem Zentrum für Innere Medizin
Kardiologie – Angiologie
des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH
Standort Gießen

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. H. Tillmanns

Gutachter: Prof. Dr. H. Tillmanns

Gutachter: Prof. Dr. T. Linn

Tag der Disputation: 08.12.2010

Meiner Familie gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungen	3
2. Einleitung	5
2.1 Endothelzellen	5
2.2 Endotheliale Permeabilität	6
2.3 Mechanismen der Schrankensteuerung	7
2.3.1 Zell-Zell-Kontakte	7
2.3.2 Aktin-Myosin-Zytoskelett (kontraktiler Apparat)	8
2.4 Insulin	10
2.4.1 Signaltransduktion	11
2.5 Ziele des Vorhabens	13
2.5.1 Bedeutung von Insulin für die Protektion der endothelialen Barrierefunktion	13
2.5.2 Ausblick	13
3. Material	14
3.1 Substanzen und Verbrauchsmaterialien	14
3.2 Antikörper	16
3.2.1 Primärantikörper	16
3.2.2 Sekundärantikörper	17
3.3 Inhibitoren	17
3.4 Geräte	18
4. Methode	19
4.1 Zellbiologische Methoden	19
4.1.1 Präparation von mikrovaskulären koronaren Endothelzellen (RCEC) adulter Ratten	19
4.1.2 Zellkultur	20
4.1.3 Methoden und Protokolle	20
4.1.4 Identifikation der Endothelzellen	21

4.2 Makromolekülpermeabilität endothelialer Zellschichten	21
4.2.1 Experimentelle Bedingungen	23
4.3 Proteinbiochemische Methoden	23
4.3.1 Proteingewinnung für die SDS-Polyacrylamid- gelelektrophorese (PAGE)	23
4.3.2 SDS-PAGE	24
4.3.3 Westernblot	25
4.4 Bestimmung der Rac1-Aktivität	26
4.5 Stickstoffmonoxid (NO)-Assay	27
4.6 Immunfluoreszenz-Mikroskopie	27
4.7 Immunpräzipitation	28
4.8 Statistische Analysen	28
5. Ergebnisse	29
5.1 Insulinrezeptoren und die endotheliale Permeabilität	29
5.2 MLC-Phosphorylierung und VE-Cadherin-Translokation durch Insulin	31
5.3 Rezeptor-vermittelte Wirkung des Insulins	33
5.4 Wirkung von Insulin auf die Akt-Phosphorylierung	35
5.5 Wirkung von Insulin auf die endotheliale NO-Produktion	38
5.6 Rac1-Aktivierung durch Insulin	40
6. Diskussion	42
7. Zusammenfassung	47
8. Summary	48
9. Literaturverzeichnis	49
10. Anhang	59

1. Abkürzungen

A	Ampère
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BSA	Rinderserumalbumin
Cadherin	calcium dependent adhesion molecule
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	1,4-Dithiothreitol
E	Einheiten der jeweiligen Enzymaktivität
EC	Endothelzellen
ECL	„Enhanced Chemiluminescence“
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykol-bis(-aminoethylether-)tetraacetat
eNOS	endotheliale NO-Synthase
ET-1	Endothelin-1
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
x g	x Erdbeschleunigung
GLUT4	Glukosetransporter Typ IV
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HBSS	Hank's balanced salt solution
HCl	Salzsäure
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-2-ethansulfonsäure
HUVEC	humane venöse Nabelschnurendothelien
IE	internationale Einheiten
IR	Insulinrezeptor
IRS	Insulinrezeptorsubstrat
kg	Kilogramm
l	Liter
m	Meter
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase

min	Minute
MLC	Myosinleichtkette
MLCK	MLC-Kinase
MLCP	MLC-Phosphatase
MLC~P	monophosphorylierte MLC
NO	Stickstoffmonoxid
N-Cadherin	non-endothelial cadherin
P	Signifikanzniveau
PAK	P-21 activated kinase
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PDK-1	Phosphoinositide-dependent kinase-1
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Konzentration
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RCEC	koronare Endothelzellen der Ratte
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
TBS	TRIS-gepufferte Salzlösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
V	Volt
VE-Cadherin	vascular-endothelial cadherin
%	Prozent
% (vol / vol)	Volumenprozent
% (wt / vol)	Gewichtsprozent
°C	Grad Celsius

2. Einleitung

2.1. Endothelzellen

Als einlagige Zellschicht bildet das Endothel die luminaire Oberfläche des gesamten Gefäßsystems. Es bildet eine physikalische Barriere zwischen Blut und umgebendem Gewebe und reguliert den Austausch von Wasser, gelösten Substanzen, Makromolekülen und Leukozyten zwischen diesen beiden Kompartimenten (Simionescu et al., 2002).

Die Endothelzellen wachsen als Monolayer, haben zusammen eine Oberfläche von ca. 6000 – 8000 m², eine Masse von ca. 1,5 kg (Bassenge 1996; Nawroth und Lasch, 1999) und bestehen aus ca. 1 – 6 x 10¹³ Zellen (Augustin et al., 1994).

Neben der antikoagulatorischen und antithrombotischen Wirkung (Sumpio et al., 2002) hat das Endothel auch eine wichtige Rolle bei der Steuerung des arteriellen Gefäßtonus (Furchgott und Zawadzki, 1980). Es ist sowohl an akuten als auch an chronischen Entzündungsprozessen involviert (Cotran, 1987; Hecker, 1999) und spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der Leukozyten-Adhäsion und -Transmigration, Hämostase, Kontraktilität der glatten Gefäßmuskulatur, Thrombozytenaktivierung und Permeabilität (Cines et al., 1998; Toborek und Kaiser, 1999).

Das Endothel übt zahlreiche komplexe Funktionen aus, wie die Sekretion von Stickstoffmonoxid (NO) zur Vasodilatation, von Endothelin-1 (ET-1) zur Vasokonstriktion sowie von Wachstumsfaktoren und chemotaktischen Faktoren. Diese Stoffe können zu strukturellen Veränderungen der Gefäßwand führen.

Endothelzellen können Ziel proinflammatorischer Signalmechanismen bei lokalen oder systemischen Entzündungen sein. Eine der ersten Manifestationen einer Inflammation ist das Versagen der endothelialen Schrankenfunktion und damit das initiale Ereignis für Prozesse der Gefäßschädigung. Durch eine mangelhafte endotheliale Barriere kommt es zu einem Austritt von serösen Flüssigkeiten ins Interstitium und dadurch zur Bildung eines Ödems.

Die generalisierte Permeabilitätszunahme ist eine frühe Manifestation der arteriellen endothelialen Dysfunktion (Gimbrone und Topper, 1999; Ross und Glomset, 1976). In der Vergangenheit wurde die Hypothese aufgestellt, dass Risikofaktoren einer koronaren Herzkrankheit Endothelzellen schädigen und somit eine Funktionsbeeinträchtigung herbeiführen, die zu einer vermehrten Ausschüttung Endothel-vermittelter, vasokonstriktorisch wirkender Substanzen führen (Vita et al., 1990). Im Konsens dazu wurde die endotheliale Dysfunktion als ein erster Schritt des Atheroskleroseprozesses vermutet (Davignon und Ganz, 2004), da eine beeinträchtigte Endothel-abhängige Vasodilatation eine der frühesten Veränderungen bei koronaren Herzerkrankungen darstellt (Scherrer et al., 1993). Unter anderem zählt hierzu ein hoher Glucosespiegel bei Diabetes mellitus (Hempel et al., 1997). In zahlreichen experimentellen und klinischen Studien wurde gezeigt, dass Diabetes mellitus eng mit einer endothelialen Dysfunktion assoziiert ist.

2.2 Endotheliale Permeabilität

Die Barrierenfunktion stellt eine der wichtigsten Aufgaben der Endothelzellen dar. Kleine wasser- und lipidlösliche Moleküle können die Endothelzellschicht durch Diffusion ohne spezifische Transportmechanismen direkt parazellulär passieren. Für Makromoleküle wie Albumin ist der vesikuläre Stoffaustausch durch die Endothelzellschicht von größerer Wichtigkeit (Lum et al., 1996). Unter inflammatorischen Bedingungen nimmt der parazelluläre Transportweg für Albumin an Bedeutung zu.

Es spielen zwei prinzipiell verschiedene Mechanismen eine besondere Rolle für die Passage von Makromolekülen durch eine Endothelzellschicht:

1. Vesikulärer Transport (Shea et al., 1969). Dieser wird gestützt durch die Entdeckung elektronenmikroskopisch sichtbarer Oberflächenvakuolen und zytoplasmatischer Vesikel (Simionescu et al., 1988), die insbesondere Makromoleküle durch die Endothelzellen hindurch transportieren. Diese Entdeckung zeigte, dass die endotheliale Barriere nicht nur als ein physikalisches Sieb fungiert (Predescu und Palade, 1993; Schnittler et al., 1990).

2. Parazelluläre Passage über interendotheliale Spalträume (Majon 1963; Carter et al., 1974). Für die parazelluläre Diffusion ist das Verhältnis Molekülgröße zu Porengröße ausschlaggebend. Für kleine Moleküle (z.B. Glucose, Molekülradius 0,36 nm) ist keine Einschränkung durch die durchschnittliche Porengröße (4 - 5 nm) der Kapillaren wahrnehmbar. Der freie Übertritt von Makromolekülen, z.B. Albumin (Molekülradius: 3,5 nm), wird auf einen Koeffizienten von 5 % reduziert. (Schmidt, Thews, 2000). Durch Aktivierung der Endothelzellen in Folge inflammatorischer Mediatoren, wie z.B. Histamin und Thrombin, kommt es zur Spaltbildung zwischen benachbarten Zellen, was zu einem Anstieg der Permeabilität führt (Majon und Palade, 1961; van Hinsbergh, 1997).

2.3 Mechanismen der Schrankensteuerung

2.3.1 Zell-Zell-Kontakte

Die Mechanismen der Schrankensteuerung beruhen einerseits auf einer Regulierung der Zell-Zell-Kontakte (tight junctions (Zonulae occludens), adherens junctions (Zonulae adhaerentes)), andererseits spielt die Kontraktion von Endothelzellen eine sehr wichtige Rolle (van Hinsbergh, 1997).

Für die mechanische Stabilität zwischen Endothelzellen sind ubiquitär vorkommende adherens junctions verantwortlich. Das VE-Cadherin (vascular-endothelial cadherin, Cadherin 5) ist das spezifische Adhäsionsmolekül in Endothelzellen. Außer über VE-Cadherin verfügen Endothelzellen auch über N-Cadherin (non-endothelial cadherin), das normalerweise in Muskel- und Nervenzellen vorzufinden ist. Jedoch ist das N-Cadherin über die ganze Zellmembran verteilt und spielt eher eine Rolle bei der Haftung der Endothelzellen mit Perizyten und Muskelzellen (Dejana et al., 1995).

Für die endotheliale Barrierestabilität ist das VE-Cadherin von elementarer Bedeutung (Dejana et al., 1999). Mehrere Studien zeigten, dass der Einsatz von Antikörpern gegen VE-Cadherin sowohl *in vitro* (Gulino et al., 1998) als auch *in vivo* zu einem Anstieg der Permeabilität führte (Corada et al., 1999 und 2001; Gotsch et al., 1997).

Durch zytoplasmatische Adapterproteine, wie z.B. α -Catenin, wird eine Verbindung zwischen dem Cadherin/ β -Catenin-Komplex und dem Aktinzytoskelett hergestellt. Mittels seiner C-terminalen Domäne kann α -Catenin direkt mit Vinculin, F-Aktin, Afadin und anderen Proteinen interagieren. Eine direkte Bindung von α -Catenin an α -Aktinin und Vinculin stabilisiert die adherens junctions am Aktinzytoskelett (Bazzoni und Dejana, 2004).

2.3.2 Aktin-Myosin-Zytoskelett (kontraktiler Apparat)

Für die mechanische Stabilität einer Zelle und ihre Form ist das Zytoskelett verantwortlich. Es dient der aktiven Bewegung einer Zelle, und es vermittelt Transportvorgänge und Signale innerhalb der Zellen (Drenckhahn, 2003). Durch die Variabilität und Anpassungsfähigkeit unterstützt das Zytoskelett die Ausbildung von speziellen Zellfortsätzen wie Mikrovilli und Zilien. In eukaryotischen Zellen werden drei verschiedene Zytoskelettfilamente unterschieden: die Aktinfilamente, die Intermediärfilamente und die Mikrotubuli. Durch Polymerisierung bilden sich aus Aktinmonomeren (G-Aktin) Mikrofilamente (F-Aktin). Sie dienen hauptsächlich der Stabilisierung der äußeren Form einer Zelle und halten membranständige Proteine, wie adherens junctions-Proteine, an ihrem Platz. Wichtige an Aktinfilamente assoziierte Proteine sind α -Aktinin, Spectrin und Filamin.

Endothelzellen besitzen außerdem einen kontraktilen Apparat, der ähnlich dem der glatten Muskelzellen aufgebaut ist (Schnittler et al., 1990; Wysolmerski und Lagunoff, 1990), bestehend aus den kontraktilen Elementen Aktin, Myosin und regulatorischen Proteinen. Durch Querbrückenbewegungen zwischen Aktin und Myosin entsteht die mechanische Grundlage für den Aufbau einer zentripetalen Spannung und einer kontraktilen Kraft in den Endothelzellen (Baldwin und Thurston, 2001; Goeckeler und Wysolmerski, 1995; Sheldon et al., 1993). In den Zellen wird die Aktin-Myosin-Interaktion hauptsächlich über den Phosphorylierungsstatus der regulatorischen Myosinleichtkette (MLC) gesteuert. Auf der einen Seite gibt es die MLC-Kinase (MLCK), die die MLC an Thr-18 und/oder Ser-19 phosphoryliert und dadurch die Aktin-Myosin Kontraktion auslöst (Garcia et al., 1995; Goeckeler und Wysolmerski, 1995; Hixenbaugh et al., 1997;

Moy et al., 1993; Sheldon et al., 1993; Verin et al., 1998). Andererseits führt die MLC-Phosphatase (MLCP) zu einer Dephosphorylierung der MLC und arbeitet damit entgegengesetzt zu der MLCK. Dieser Effekt führt zu einer Endothelzellrelaxation (Verin et al., 1995).

Die Bedeutung des Zytoskeletts für eine intakte Funktion der endothelialen Barriere konnte in mehreren Studien demonstriert werden. Beispielsweise führt eine Depolymerisierung des Zytoskeletts durch Cytochalasin D *in vivo* zu einem deutlichen Anstieg der Permeabilität und *in vitro* zur Entstehung großer interendothelialer Lücken (Blum et al., 1997; Haselton et al., 1996; Waschke et al., 2005).

Rho-GTPasen können ebenfalls das Aktinzytoskelett regulieren. Rho-GTPasen sind niedermolekulare, GTP-bindende Proteine, die zur Ras-Superfamilie gehören. So spielt die Rho-GTPasen-vermittelte Formation des Zytoskeletts bei der Phagozytose, Zellmigration, Pino- und Exozytose, Vesikeltransport, Zytokinese und Axonwachstum eine besondere Rolle (Jaffe und Hall, 2005; Ridley, 2001a und 2001b). Durch Regulation des Zytoskeletts üben Rho-GTPasen auch einen großen Einfluss auf die endotheliale Barrierefunktion aus. Die Rho-GTPasen, Rac1 und Rho A, haben eine überwiegend antagonistische Wirkung (Vandenbroucke et al., 2008; Wojciak-Stothard und Ridley, 2002; Wojciak-Stothard et al., 2005), wobei Rac1 die endotheliale Barriere stabilisiert und Rho A destabilisiert.

Neben der Regulation des Zytoskeletts haben Rac-GTPasen Einfluss auf den Verlauf des Zellzyklus, die Zellpolarität, die dynamischen Prozesse der Mikrotubuli, die transmembranösen Transportvorgänge und die Aktivität von Transkriptionsfaktoren und Enzymen (Etienne-Manneville und Hall, 2002). Zur Regulation verschiedener Signalkaskaden interagieren die Rac-GTPasen mit Effektoren, die wiederum die Signale durch Aktivierung oder Inaktivierung nachgeschalteter Zielproteine weitergeben. So ist z. B. die Serin/Threonin-Kinase PAK wesentlich an den dynamischen Prozessen des Aktin-Zytoskeletts beteiligt (Bagrodia und Cerione, 1999; Bishop und Hall, 2000).

2.4 Insulin

Das erstmalig 1921 von Frederick Banting und Charles Best aus Rinderpankreas isolierte Insulin (Banting et al., 1922) ist ein lebenswichtiges Peptidhormon, das in den β -Zellen der Langerhansschen Inseln des Pankreas gebildet wird. Insulin ist das einzige Hormon, das den Blutzuckerspiegel senken kann. Die Insulinfreisetzung erfolgt biphasisch. Innerhalb von zwei bis fünf Minuten nach Sekretionsreiz durch Glucose wird das in den β -Zellen gespeicherte Insulin freigesetzt (erster Peak). Bei andauerndem Reiz kommt es zu einer anhaltenden Insulinbiosynthese und -abgabe. Da der minimale Zeitraum, Insulin zu synthetisieren und in die Blutbahn auszuschleusen, ca. eine Stunde beträgt, ist der zweite Insulinpeak etwa nach dieser Zeit im Blut zu messen (Ammon et al., 2000).

Die Halbwertszeit von Insulin im Serum beträgt nur 7 – 15 min, da es rasch durch in der Blutbahn zirkulierende Enzyme abgebaut wird. Die Internalisierung von Insulin-Rezeptor-Komplexen erfolgt vor allem in Muskelzellen.

Neben den metabolischen Wirkungen wurde in verschiedenen Studien gezeigt, dass eine gesteigerte Insulinkonzentration zu einer Zunahme der Durchblutung der Extremitäten und zu einer Abnahme des Gefäßwiderstandes führt (Baron et al., 1990; Scott et al., 2002; Vincent et al., 2006; Kelley et al., 1988). Diese Effekte erscheinen schon bei physiologischen Insulinkonzentrationen und nach einer relativ kurzen Zeit (30 - 60 min). Neben der vasodilatativen Wirkung von Insulin sind auch vasokonstriktorische Effekte beschrieben worden. Diese Wirkung erfolgt über das sympathische Nervensystem und nach Freisetzung des Vasokonstriktors ET-1 aus dem Gefäßendothel (Anderson et al., 1991; Lembo et al., 1992; Rowe et al., 1981). Unter physiologischen Bedingungen ist der Einfluss des Insulins auf den Blutdruck gering, da sich die vasodilatatorischen und vasokonstriktorischen Wirkungen gegenseitig aufheben. Nur kurzfristig führt Insulin unter euglykämischen Bedingungen zu einer geringen Reduktion des arteriellen Blutdrucks (Baron und Brechtel, 1993).

Darüber hinaus steigert Insulin den myokardialen Blutfluss. Dies ist vor allem für Patienten beschrieben worden, die an Diabetes mellitus, arterieller

Hypertonie, Hyperlipidämie, Adipositas und koronarer Herzkrankheit leiden, das heißt an typischen Erkrankungen einer endothelialen Dysfunktion (Sundell et al., 2002; McNulty et al., 2000; Rogers et al., 1977; Fath-Ordoubadi und Beatt, 1997).

Verschiedene klinische und experimentelle Studien, die sich mit Ischämie/Reperfusion befassen haben, konnten zeigen, dass eine Insulingabe zum Zeitpunkt der Reperfusion vor dem myokardialen Reperfusionsschaden schützt (Ma et al., 2006). Dies konnte für isolierte Kardiomyozyten ebenfalls demonstriert werden (Abdallah et al., 2006). Diese Strategie geht auf das Behandlungsschema eines akuten Myokardinfarktes aus den 60er Jahren (Sodi-Pallares et al., 1962) und auf die Resultate der DIGAMI-1 Studie (Malmberg et al., 1995) zurück. Bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt, die einer frühen Glukose-Insulin-Kalium-Infusionstherapie zugeführt wurden, konnte die Mortalität im Krankenhaus signifikant gesenkt werden. Aktuelle Studien zeigen, dass bei Patienten, die mehr als drei Tage Betreuung auf der Intensivstation nötig haben, durch eine intensive Insulintherapie die Mortalität von 52,5 % auf 43 % gesenkt werden konnte (Van den Berghe et al., 2006).

Die bisherigen Untersuchungen haben sich vor allem auf den myokardialen Schaden oder die (indirekten) vasomotorischen Wirkungen von Insulin konzentriert. Die Rolle von Insulin auf die endotheliale Schrankenfunktion wurde bisher noch nicht näher untersucht.

2.4.1 Signaltransduktion

Insulinrezeptoren (IR) konnten auf Endothelzellen aus verschiedenen Stromgebieten nachgewiesen werden (Bar und Boes, 1984). Die biologische Wirkung von Insulin entfaltet sich nach Bindung an den Insulinrezeptor. Der Rezeptor ist ein transmembranäres Glykoprotein, das aus je zwei Untereinheiten besteht, den α - und β -Untereinheiten. Die zwei α -Untereinheiten stellen die extrazelluläre Bindungsstelle dar, die zwei β -Untereinheiten beinhalten die intrazelluläre Rezeptor-Tyrosinkinase (Rosen et al., 1987; Kahn et al., 1985).

Die spezifische Bindung des Insulins an seinen Zelloberflächenrezeptor löst eine Konformationsänderung im Rezeptormolekül aus, die die Tyrosinkinase

im zytosolischen Abschnitt der β -Untereinheit aktiviert. An diese Bindungsstelle „dockt“ das Insulinrezeptorsubstrat (IRS) an und wird dadurch selbst wieder zur Bindungsstelle für die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K). Dies führt über „phosphoinositide-dependent kinase-1“ (PDK-1) und Akt (Alessi et al., 1997; Vanhaesebroeck und Alessi, 2000) zur Phosphorylierung und Aktivierung der endothelialen NO-Synthase (eNOS) (Montagnani et al., 2001 und 2002; Zeng et al., 1996 und 2000).

PI3K/Akt ist ein bedeutender Knotenpunkt in der zellulären Signaltransduktion. Sie reguliert verschiedene Prozesse, wie die GLUT4-Translokation an die Plasmamembran, den Glykogenmetabolismus, Proteine, welche die Apoptose beeinflussen, und Transkriptionsfaktoren (Frame und Cohen, 2001; Khan und Pessin, 2002; Vanhaesebroeck und Waterfield, 1999).

Die eNOS katalysiert die Umwandlung von L-Arginin zu L-Citrullin, bei der Stickstoffmonoxid (NO) entsteht. Vergleichende Studien zwischen gesunden und atherosklerotisch veränderten Gefäßwänden des Menschen zeigten, dass eNOS in Endothelzellen gesunder Gefäßwände exprimiert wird, jedoch in atherosklerotischen Läsionen reduziert ist (Wilcox et al., 1997). Außerdem wird über eine verminderte NO-Bioverfügbarkeit unter Ischämie/Reperusions-Bedingungen (Kurose et al., 1994), in atherosklerotischen Läsionen (Oemar et al., 1998), bei Hypercholesterinämie (Feron et al., 1999), bei arterieller Hypertonie (Hamilton et al., 2001) und bei Diabetes mellitus (Hink et al., 2001) berichtet.

Neben dem PI3K-abhängigen Insulinsignalweg gibt es einen weiteren Ras/Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK)-Weg. Dieser Weg dient vor allem der Regulation des Wachstums, der Migration, steigert die Produktion des NO-Gegenspielers ET-1 und induziert damit eine verstärkte Vasokonstriktion (Nystrom und Quon, 1999; Formoso et al., 2006; Marasciulo et al., 2006).

2.5 Ziele des Vorhabens

2.5.1 Bedeutung von Insulin für die Protektion der endothelialen Barrierenfunktion

Das Ziel dieser Studie war, (1) zu klären, ob Insulin die Barrierenfunktion von mikrovaskulären Endothelzellen verstärkt, (2) dieser Barriere-verstärkende Effekt durch PI3K-vermittelte NO-Produktion zu Stande kommt und (3) die gesteigerte NO-Produktion zu einer Rac1-vermittelten Verstärkung der endothelialen Barrierenfunktion beiträgt. Diese Studie wurde an einem etablierten Modell der mikrovaskulären Endothelzellen des Rattenherzens durchgeführt.

2.5.2 Ausblick

Langfristiges Ziel ist es, neue Barrieren-stabilisierende und antiatherosklerotische Therapieoptionen für Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen zu entwickeln und Nebeneffekte bereits bekannter Therapiemodalitäten zu verstehen.

3. Material

3.1 Substanzen und Verbrauchsmaterialien

Acrylamid-Lösung (40%)	Amersham Pharmacia, GB
Acrylamid	Carl Roth, Karlsruhe
Albumin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ammonium Persulfat	SERVA, Heidelberg
Ammonium Sulfat	Merck, Darmstadt
Basismedium [®]	PromoCell, Heidelberg
Benzonase [®]	Merck, Darmstadt
Bisacrylamid Lösung (2%)	Amersham Pharmacia, GB
Bisacrylamid	Carl Roth, Karlsruhe
Bovines Serumalbumin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bromophenol Blau	Sigma-Aldrich, Steinheim
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Collagenase Type II	CellSystem, St. Katharinen
Complete [®] (Protease-Hemmer Cocktail)	Roche, Mannheim
Costar Transwell [®] Filtermembran	Vitaris, Baar
DAF-FM	Invitrogen, Karlsruhe
Deckglas	Schott, Mainz
Diethylether	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dithiothreitol	Amersham Pharmacia, GB
EDTA	Carl Roth, Karlsruhe
EGTA	Boehringer, Mannheim
Einweg-Zellschaber	BD, Heidelberg
ELISA Platten (96 well)	BD, Heidelberg
Falcon Röhrchen (15 ml, 50 ml)	BD, Heidelberg
Fettfreies Magermilchpulver	Applichem, Darmstadt
Filterpapier	Biotech-Fischer, Reiskirchen
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA, Pasching, Österreich
Gentamycin	Gibco BRL, Eggenstein

Glycerol (100%)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycerol (70%)	Amersham Pharmacia, GB
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
HBSS	PAA, Pasching, Österreich
HEPES	Sigma-Aldrich, Steinheim
Insulin (human recombinant)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kulturschalen	BD, Heidelberg
Lysispuffer	Pierce Biotech, Bonn
M199 Medium	Dianova, Hamburg
Magnesiumchlorid	Fluka, Schweiz
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
β -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Millipore Wasser	Millipore, Eschborn
Molekulargewichtsmarker	Schleicher und Schuell, Dassel
Natriumbikarbonat	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumfluorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumhydroxid	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Nitrocellulosemembran	Schleicher und Schuell, Dassel
Nonidet P-40	Sigma-Aldrich, Steinheim
Penicillin/Streptomycin	Gibco BRL, Eggenstein
Phalloidin-TRITC	Sigma-Aldrich, Steinheim
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
PMSF	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ponceau-S-Lösung	SERVA, Heidelberg
Pre-stained Proteinmarker	Invitrogen, Karlsruhe
Protein-G-gekoppelte Magnetic Beads	Invitrogen, Karlsruhe
Rac1-Pulldown-Assay Kit	Cytoskeleton, USA

Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Saccharose	Sigma-Aldrich, Steinheim
See Blue [®] prestained marker	Invitrogen, Karlsruhe
Skalpell	Feather, Japan
Spritzen (2 ml, 20 ml)	BD, Heidelberg
Super signal-west [®] (ECL Lösung)	Pierce Biotech, Bonn
TEMED	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tris	Carl Roth, Karlsruhe
Triton X-100	SERVA, Heidelberg
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypsin/EDTA-Lösung	Biochrom, Berlin
Tween 20	Amersham Pharmacia, GB
Whatmann [®] 3MM Filterpapier	Millipore, Eschborn

3.2 Antikörper

3.2.1 Primärantikörper:

Aktin (Clone C4, Maus, IgG)	Sigma-Aldrich, Steinheim
VE-Cadherin (Kaninchen, IgG, polyklonal)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Insulinrezeptor (Clone 29B4, Maus, monoklonal)	Calbiochem, Bad Soden
Phospho-Akt (Ser473, Kaninchen, IgG, polyklonal)	Cell Signaling, USA
Phospho-MLC (Thr 18/ Ser 19, Kaninchen, IgG, polyklonal)	Cell Signaling, USA
Phospho-Tyrosin (pY20, Maus, monoklonal)	BD, Heidelberg
Rac1 (Maus, IgG, monoklonal)	Cytoskeleton, USA
Vinculin (Clone hVIN-1γ, Maus, IgG, monoklonal)	Sigma-Aldrich, Steinheim

3.2.2 Zweitantikörper (HRP-markiert):

Anti-Maus (IgG) – HRP-markiert	BD, Heidelberg
Anti-Kaninchen (IgG) – HRP-markiert	Upstate, USA
Anti-Kaninchen (IgG) – Alexa Fluor 633-markiert	Invitrogen, Karlsruhe

3.3 Inhibitoren

Genistein (<i>4',5,7-Trihydroxyisoflavone, 5,7-Dihydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-one</i>)	Calbiochem, Darmstadt
HNMP(AM) ₃ (<i>Hydroxy-2-naphthalenylmethyl-phosphonic acid tris acetoxymethyl ester</i>)	Calbiochem, Darmstadt
L-NAME (<i>N_ω-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride</i>)	Calbiochem, Darmstadt
L-NNA (<i>N_ω-Nitro-L-arginine</i>)	Calbiochem, Darmstadt
LY294002 (<i>2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-1(4H)-benzopyran-4-one hydrochloride</i>)	Calbiochem, Darmstadt
NSC23766 (<i>N-[N-(3,5-difluorophenacetyl-L-alanyl)]-S-phenylglycine t-butyl ester (DAPT)</i>)	Calbiochem, Darmstadt
Wortmannin	Calbiochem, Darmstadt

3.4 Geräte

Beckman Allegra 64R Zentrifuge	Beckman Coulter, USA
Beckman Allegra 25R Zentrifuge	Beckman Coulter, USA
Blotkammer	Biotech-Fischer, Reiskirchen
Elektrophoresegerät	Biometra, Göttingen
Elisa Reader Fluoscan Ascent FL	Tecan, Schweiz
Geldokumentationssystem Quantity One	Bio-Rad, München
Hamiltonspritze	Hamilton, Bonaduz, Schweiz
Inkubator	Heraeus, Hanau
Konfokales Mikroskop	Zeiss, Jena
Magnetic Beads	Invitrogen, Karlsruhe
Magnetrührer	Jahnke und Kunkel, Staufen
Magnetstäbchen	Invitrogen, Karlsruhe
Minigelapparatur Protean II	Biorad, München
Netzgeräte	Biometra, Goettingen
Neubauerzählkammer	Superior, Marienfeld
Phasenkontrastmikroskop	Olympus, Japan
pH-Meter	WTW, Weinheim
Photometer	Carl Zeiss, Jena
Pipetten	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Schüttler	Biometra, Göttingen
Sepharose Beads	Invitrogen, Karlsruhe
Spektrometer Specord S10	Analytik Jena, Jena
Sterilbank	Heraeus, Hanau
Table top (Zentrifuge)	Eppendorf, Hamburg
Vortexer	Heidolph, Kelheim
Wasserbad	Julabo, Seelbach
Wasserdemineralisationseinheit	Millipore, Eschborn

4. Methoden

4.1 Zellbiologische Methoden

4.1.1 Präparation von mikrovaskulären koronaren Endothelzellen (RCEC) adulter Ratten

Die Isolierung der mikrovaskulären, koronaren Endothelzellen wurde nach der von Piper et al. (1990) beschriebenen Methode durchgeführt.

Nach einer Äthernarkose wurden die Tiere (200 - 250 g schwere, 3 - 4 Monate alte Wistar-Ratten-Männchen) durch Genickbruch getötet. Anschließend wurde der Thorax geöffnet, Herz und Lunge angehoben, vom restlichen Körper getrennt und sofort in kalte, isotonische Kochsalzlösung gelegt. In dieser Lösung wurde das Herz freipräpariert und danach über die Aorta an einer Langendorff-Apparatur fixiert. Daraufhin wurde das Herz mit 40 ml Powellmedium (Zusammensetzung: 85 mM NaCl, 25 mM NaHCO₃, 2,6 mM KCl, 1,2 mM KH₂PO₂, 1,2 mM MgCl₂·H₂O, 25 mM Hepes und 11 mM Glukose, pH 7,4) perfundiert, um das verbliebene Blut aus den Koronarien zu entfernen. Im Anschluss daran erfolgte für 40 min eine rezirkulierende Perfusion (2 - 3 ml/min) mit dem Kollagenasepuffer (Zusammensetzung: 40 ml Powellmedium, 25 mg Kollagenase, 1,0 mM CaCl₂). Das Medium wurde dabei konstant auf 37 °C erwärmt. Nach der Rezirkulationsphase wurde das Herz unterhalb der Vorhöfe von der Langendorff-Apparatur abgeschnitten und mechanisch mit einem Gewebehacker zerkleinert. Anschließend wurde das Zellhomogenat 10 min in Kollagenasepuffer (37 °C) unter Carbogenbegasung inkubiert. In dieser Lösung wurde die Vereinzelung der Endothelzellen durch vorsichtiges Auf- und Absaugen mit einer 10 ml Pipette unterstützt. Als nächster Schritt folgte die Filtration der Zellsuspension durch ein Nylonnetz (200 µm Porengröße), um die verbliebenen Zellaggregate abzutrennen. Das Filtrat wurde danach bei 15 x g für 3 min zentrifugiert. Der Überstand über dem Pellet aus Herzmuskelzellen wurde abgehoben und zwei weiteren Zentrifugationsschritten unterzogen (20 x g und 25 x g, je 3 min). Danach wurde die Zellsuspension eines Herzens mit einer Dichte

von ca. 10^6 pro 10 cm Plastik-Kulturschale ausplattiert und im CO₂-Brutschrank (5 % CO₂, 37 °C) für 2 h inkubiert.

4.1.2 Zellkultur

Nach Ablauf der Inkubationszeit von 2 h wurden die mit Endothelzellen beschichteten Kulturschalen mit 1xPBS-Lösung (Zusammensetzung: 7,8 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, pH 7,4) gewaschen, anschließend mit 20 ml des Kultivierungsmediums (Zusammensetzung: M199 CO₂ (9,62 g/l Medium 199/Earl's Salts, 15 mM HEPES, 24 mM NaHCO₃, mit Carbogen für mindestens 1 h begasen), 20 % (vol/vol) NCS/FCS, 2 % (vol/vol) Penicillin/Streptomycin, pH 7,4) überschichtet und im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert.

4.1.3 Methoden und Protokolle

Das Medium wurde jeden zweiten Tag gewechselt. Nach sieben Tagen waren die Zellen konfluent und konnten trypsinisiert werden. Dazu wurden die Endothelzellen mehrmals mit 1xPBS-Lösung (siehe 4.1.2) gewaschen. Anschließend wurden sie mit 6 ml 0,25 % (wt/vol) Trypsin/EDTA-Lösung bei 37 °C 2 min lang inkubiert. Mit 1,5 ml FCS wurde der Verdauungsvorgang geblockt und die Zellen mechanisch, durch Auf- und Absaugen mit einer 10 ml Pipette, voneinander getrennt. Nach dem Zentrifugieren (250 x g, 10 min) der Zellsuspension wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet mit 37 °C warmem Kultivierungsmedium resuspendiert und auf die Filter bzw. Kulturschalen, mit einer Dichte von etwa $4,5 \times 10^4$ Zellen pro cm² ausplattiert. Am dritten Tag war auf den Kulturschalen bzw. Filtern ein konfluenten Monolayer gewachsen, der für die Versuche verwendet werden konnte.

4.1.4 Identifikation der Endothelzellen

In regelmäßigen Abständen wurde durch Institutsmitarbeiter die Reinheit der Zellkulturen mittels immunfluoreszenzmikroskopischen Antikörpernachweises des von Willebrand-Faktors untersucht. Als fluoreszierender Zweitantikörper wurde ein an FITC gekoppelter Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper benutzt. Vor jedem Versuch wurden die RCEC mikroskopisch auf ihre typische „Pflastersteinmorphologie“ überprüft.

4.2 Makromolekülpermeabilität endothelialer Zellschichten

Die Untersuchung der Permeabilität der Endothelzellen wurde in einem Zweikammersystem, getrennt durch eine Filtermembran (Noll et al., 1995), durchgeführt. Das obere als auch das untere Kompartiment beinhalteten als Basismedium modifizierte Tyrodelösung (Zusammensetzung: 150 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,2 mM KH_2PO_4 , 1,2 mM MgSO_4 , 1,0 mM CaCl_2 und 30,0 mM N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure; pH 7,4, 37 °C), ergänzt mit 0,5 % (vol/vol) FCS. Es bestand keine hydrostatische Druckdifferenz zwischen beiden Kompartimenten.

Das obere „luminale“ Kompartiment, das die Endothelzellschichten enthielt, hatte ein Volumen von 2,5 ml und das untere „abluminale“ Kompartiment ein Volumen von 9,8 ml. Das Medium im abluminalen Kompartiment wurde kontinuierlich mit einem magnetischen Mikrorührer (60 Umdrehungen pro Minute) gemischt.

Dem „luminalen“ Kompartiment wurde Trypanblau-markiertes Albumin (60 μM) zugegeben. Das Trypanblau-markierte Albumin wurde durch die Inkubation äquimolarer Mengen von bovinem Serumalbumin und Trypanblau über Nacht in Basalmmedium hergestellt (Zusammensetzung: 120 ml HBSS, 200 μg Trypanblau, 4,8 g Albumin). Zur Überprüfung einer vollständigen Bindung des Trypanblaus mit dem Albumin wurde das Trypanblau-markierte Albumin mit Perchlorsäure ausgefällt und photometrisch (Wellenlänge 600 nm) untersucht, ob ungebundenes, freies Trypanblau zu finden war.

Über einen geschlossenen Pumpkreislauf wurde kontinuierlich das Trypanblau-markierte Albumin aus dem „abluminalen“ Kompartiment durch eine Durchflussskivette gepumpt und dort fortlaufend mittels Spektrophotometer bestimmt, das mit einem Zwei-Wellenlängen-Modus arbeitet (Wellenlänge zur Messung des Trypanblaus: 600 nm, gegen Kontroll-Wellenlänge: 700 nm). Mit einer Zeitverzögerung von maximal 15 s wurde eine Zunahme der Konzentration von Trypanblau-markiertem Albumin gemessen.

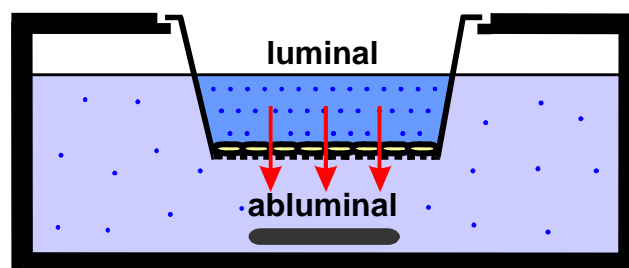
Der Albuminfluss (F , angegeben in $\text{mol}/(\text{s} \times \text{cm}^2)$) durch den Monolayer der Fläche (S) berechnet sich durch die Änderung der Albuminkonzentration ($d[A]_2$) über die Zeit (dt) im Volumen des abluminalen Kompartiments (V):

$$F = \frac{d[A]_2}{dt \times V} \times \frac{1}{S}$$

Der Permeabilitätskoeffizient (P , angegeben als cm/s), der die Durchlässigkeit des kombinierten Systems, bestehend aus dem endothelialen Monolayer und dem Polycarbonatfilter, erfasst, wurde wie folgt berechnet:

$$P = \frac{F}{[A]_1 - [A]_2}$$

$[A]_1$ steht für die Albuminkonzentration im luminalen und $[A]_2$ für die des abluminalen Kompartiments. Die relativen Veränderungen des Albuminflusses (F) entsprechen denen des Permeabilitätskoeffizienten (P), weil die treibende Kraft ($[A]_1 - [A]_2$) im Laufe des Experimentes praktisch konstant blieb.



Zwei-Kompartimenten-System

4.2.1 Experimentelle Bedingungen

Zur Bestimmung der Makromolekülpermeabilität wurden die Filtermembranen mit darauf kultivierten Endothelzellschichten in die Inkubationskammer überführt. Als Inkubationsmedium diente eine modifizierte Tyrodelösung (siehe 4.2). Nach einer Äquilibrationsperiode von 20 min wurde die Basalpermeabilität der Endothelzellschichten über einen Zeitraum von 20 min bestimmt. Weitere Substanzen wurden wie angegeben zugeführt und die Reaktion im Hinblick auf die Albuminpermeabilität für weitere 130 min aufgezeichnet. Die Stammlösungen von L-NAME und L-NNA wurden kurz vor Gebrauch mit dem Inkubationsmedium angesetzt. Die Stocklösungen von Wortmannin, HNMP(AM)₃ und Genistein wurden mit Dimethylsulfoxid (DMSO) hergestellt. Die Stammlösungen wurden in einer finalen Konzentration < 0,1 % (vol/vol) eingesetzt. Alle durchgeführten Kontrollversuche enthielten dieselbe Endkonzentration an DMSO.

In Konzentrationsreihen wurde für die einzelnen Substanzen die effektivste Dosis bestimmt. Dies ergab für Insulin 1 IE/ml, Wortmannin 1 µM, Genistein 10 µM, L-NAME 100 µM, L-NNA 100 µM und HNMP(AM)₃ 10 µM.

4.3 Proteinbiochemische Methoden

4.3.1 Proteingewinnung für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Für die Proteingewinnung wurden RCEC in Zellkulturschalen (Ø 3,5 cm) ausplattiert. Nach der Inkubation wurde das Medium abgesaugt und die Zellen durch die Zugabe von 150 µl, auf 65 °C erhitztem, 2xSDS-PAGE Probenpuffer (Zusammensetzung: 125 mM Tris/HCl, 20 % (vol/vol) Glycerol, 4 % (wt/vol) SDS, 0,5 mM DTT, 5 % (vol/vol) β-Mercaptoethanol, 0,5 mM Natriumorthovanadat und 0,001 % (wt/vol) Bromophenolblau, pH 6,8) lysiert. Danach wurde den Zellkulturschalen Benzonase® (5 IE/ml) zugegeben und die Schalen für 15 min auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem Einwegscharer abgeschabt, in je ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei

95 °C für 5 min durch Erhitzen denaturiert. Im Anschluss daran wurden die Proben für 30 s mit 14.000 Umdrehungen pro min in einer Eppendorfszentrifuge zentrifugiert. Die Proben wurden direkt weiterverarbeitet (4.3.2) oder bei -20 °C aufbewahrt.

4.3.2 SDS-PAGE

Die Auftrennung der Gesamtzellextrakte erfolgte anhand einer modifizierten, diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970). Von jeder Probe wurden 60 µl des Lysats mit einer Hamiltonspritze in die Geltaschen appliziert. Zur Bestimmung des Molekulargewichts und zur Laufkontrolle wurde stets auch ein Molekulargewichtsmarker pro Gel aufgetragen. Der prozentuale Anteil der Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung am Trenngel (Zusammensetzung: 12,1 ml Acrylamid (30 % (wt/vol)), 6,5 ml Bisacrylamid (2 % (wt/vol)), 9,5 ml Trenngelpuffer (1,5 M Tris/HCl, pH 8,8), 10,9 ml Aqua bidest., 400 µl SDS 10 % (wt/vol), 30 µl TEMED, 400 µl APS 10 % (wt/vol)) betrug 12,5 %. Die Sammelgele (Zusammensetzung: 4,4 ml Acrylamid (30 % (wt/vol)), 2,4 ml Bis-Acrylamid (2 % (wt/vol)), 16,5 ml Aqua bidest., 6 ml Sammelgelpuffer (0,5 M Tris/HCl, pH 6,8), 0,25 ml SDS 10 % (wt/vol), 20 µl TEMED, 0,25 ml APS 10 % (wt/vol)) hatten eine konstante Acrylamid-Bisacrylamid-Konzentration von 6 %. Nach gründlichem Mischen wurde das Trenngel blasenfrei zwischen die Glasplatten gegossen und mit Aqua bidest. überschichtet. Nach dreistündiger Polymerisation wurde das Wasser abgeschüttet, die Sammelgellösung auf das Trenngel gegossen und der Profilformer für die Taschen eingesetzt. Anschließend wurde die Elektrophoresekammer in ein mit Laufpuffer (Zusammensetzung: 192 mM Glycin, 24,8 mM Tris/HCl, 1 % (wt/vol) SDS) gefülltes Gefäß gestellt und ebenso in die obere Aussparung der Kammer Laufpuffer gegeben.

Die vertikale Gelelektrophorese wurde bei 200 V in einer Mini-Gelapparatur durchgeführt.

4.3.3 Westernblot

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine konnten mit Hilfe des Westernblots qualitativ und quantitativ nachgewiesen werden. Zudem konnte deren Größe annäherungsweise bestimmt werden. Die Proteine wurden in einer mit Westernblot-Puffer (Zusammensetzung: 25 mM Tris, 150 mM Glycin, 10 % (vol/vol) Methanol, pH 8,3) gefüllten Blotkammer im „Semi-Dry-Blotting-Verfahren“ bei 0,8 – 0,9 mA/cm² auf eine Nitrocellulose-Membran elektrophoretisch transferiert. Nach 60 – 100 min Blotten wurde das Polyacrylamidgel verworfen und die Proteine auf der Membran mit Hilfe von Ponceau-S-Lösung reversibel angefärbt, um die Bloteffizienz zu überprüfen. Anschließend wurden die Proteine mit TBST-Puffer (Zusammensetzung: 10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1 % (vol/vol) Tween 20, pH 7,4) entfärbt und die freien Bindungsstellen der Membran für 60 min mit 3 % (wt/vol) BSA in TBST-Puffer blockiert. Danach wurde die Membran 5 min in TBST-Puffer gewaschen. Die Inkubation mit dem spezifischen Primärantikörper in 3 % (wt/vol) BSA-haltigem TBST-Puffer erfolgte entsprechend den in Tab. 4-1 angegebenen Bedingungen. Im Folgenden wurde die Membran dreimal in TBST-Puffer gewaschen. Der entsprechende Sekundärantikörper (Tabelle 4-1) wurde in 3 % (wt/vol) BSA-haltigem TBST-Puffer verdünnt und für 60 min bei Raumtemperatur unter Schwenken mit der Membran inkubiert. Danach wurde die Membran wieder dreimal mit einem TBST-Puffer gewaschen. Die Auswertung der Membran wurde mittels des Verfahrens der „Enhanced Chemiluminescence“ (ECL) durchgeführt. Bei diesem Verfahren wurde die Membran für ca. 1 min in 2 ml ECL-Lösung getränkt und dann auf eine Glasplatte gelegt. Um einer Austrocknung vorzubeugen, wurde die Glasplatte mit Frischhaltefolie überzogen. Die densitometrische Auswertung des Westernblots erfolgte mit der Software Quantity One 4.4.1. Die Banden der zu untersuchenden aktivierten (phosphorylierten) Proteine wurden entweder zum Gesamtprotein, Aktin oder Vinculin als Beladungskontrolle ins Verhältnis gesetzt.

Tabelle 4-1: Primär- und Sekundärantikörper

Primärantikörper	Verdünnung	Sekundärantikörper	Verdünnung
Anti-Aktin	1:1000	Anti-Maus IgG	1:5000
Anti-Phospho-Akt	1:1000	Anti-Kaninchen IgG	1:2000
Anti-Phospho-MLC	1:1000	Anti-Kaninchen IgG	1:1000
Anti-Phospho-Tyrosin	1:1000	Anti-Maus IgG	1:1000
Anti-Rac1	1:1000	Anti-Maus IgG	1:1000
Anti-Vinculin	1:1000	Anti-Maus IgG	1:5000

4.4 Bestimmung der Rac1-Aktivität

Die Aktivität von Rac1 wurde mittels eines Rac1-Pull-Down-Assays nach Anleitung des Herstellers bestimmt. Rac1 bindet mit seiner GTPase-Bindungsstelle mit hoher Affinität an PAK. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte durch Nachweis der Bindung der aktiven, GTP-gebundenen Form von Rac1 an die GST-PAK-bindende Domäne. Konfluente endotheliale Monolayer wurden in 100 mm Kulturschalen mit entsprechenden Substanzen stimuliert. Anschließend wurden sie mit eiskaltem 1xPBS (siehe 4.1.2) gewaschen und mit 600 µl Lysispuffer pro Schale für 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die lysierten Zellen durch Schaben mit einem Gummischaber abgeerntet und durch mehrfaches Passagieren durch eine 26 G Kanüle (4 - 5 mal) lysiert. Das hieraus gewonnene Lysat wurde zentrifugiert (14.000 x g für 5 min bei 4 °C). Zur Bestimmung der Gesamt-Rac1-Menge wurde aus dem Überstand eine kleine Menge (50 µl) abgehoben. Der restliche Überstand wurde anschließend für 45 min bei 4 °C mit Glutathion-gekoppelten Sepharos e-Beads, an die die GST-PAK-Domäne kovalent gebunden war, inkubiert. Diese Beads wurden nach Beendigung der Inkubation mit Waschpuffer (Zusammensetzung: 25 mM Tris/HCl, 1 % (vol/vol) Triton X-100, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 0,5 mM PMSF, pH 7,4) gewaschen und danach bei 14.000 x g für 30 s bei 4 °C abzentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde dreimal wiederholt. Das Sediment (Pull-Down), das die GST-PAK-Beads mit dem daran gebundenen, aktiven Rac1 enthielt, wurde im Anschluss in 2xLysispuffer aufgenommen und gelelektrophoretisch mittels SDS-PAGE getrennt. Der Nachweis von Rac1 erfolgte mittels Westernblot-Analyse unter Verwendung eines Anti-Rac1-Antikörpers.

4.5 Stickstoffmonoxid (NO)-Assay

Die intrazelluläre NO-Konzentration wurde mittels NO-spezifischem Diaminfluoreszein-FM-Diacetat (DAF-FM) bestimmt. Das zellpermeable DAF-FM-Diacetat wird in der Zelle von zytosolischen Esterasen acetyliert, wodurch DAF-FM freigesetzt wird und mit NO reagieren kann. Dabei werden das Oxidationsprodukt N_2O_3 und das stark fluoreszierende DAF-FM-Triazol gebildet. Mit einem Tecan Ascent FL fluorescent plate reader wird das freigesetzte DAF-FM-Triazol bei einer Wellenlänge von $\lambda_{\text{ex}} = 495 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em}} = 515 \text{ nm}$ gemessen.

Am Tag der NO-Messung wurden die konfluenten RCEC-Kulturen zweimal mit 1xPBS (siehe 4.1.2) gewaschen und mit $5 \mu\text{M}$ DAF-FM-Diacetat, gelöst in DMEM, für 30 min inkubiert, danach nochmals mit 1xPBS gewaschen und mit HBSS für 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen Insulin in An- und Abwesenheit des NOS-Inhibitors stimuliert. Nach 30-minütiger Inkubation wurde die DAF-FM-Triazol-Fluoreszenz gemessen.

Die Ergebnisse wurden durch die Subtraktion der unspezifischen Fluoreszenz, gemessen in mit DAF-FM-Diazetat unbehandelten Schalen, korrigiert. Es wurden vier Messungen pro Bedingung durchgeführt und diese Werte zu einem Wert gemittelt.

4.6 Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Für die Immunfluoreszenz-Mikroskopie wurden die Zellen auf mit Kulturmedium (30 min, 37°C) beschichteten Deckgläschen ($\varnothing 15 \text{ mm}$) in Kulturschalen ausgesät. Die konfluenten endothelialen Monolayer wurden dreimal mit 1xPBS (siehe 4.1.2) gewaschen, dann mit eiskaltem 100% Methanol für 20 min bei -20°C fixiert und nochmals dreimal mit 1xPBS gewaschen. Zur Darstellung von VE-Cadherin wurden die Zellen mit dem Erst-Antikörper ($150 \mu\text{l}$ Anti-pan-Cadherin, 1:100 gelöst in 1xPBS) bedeckt und für 12 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Deckglas dreimal mit 1xPBS gewaschen. Im Folgenden wurde den Proben der Zweit-Antikörper ($150 \mu\text{l}$ FITC-konjugiertes Anti-rabbit IgG, 1:200 gelöst in 1xPBS) zugegeben und für 1 h bei 37°C inkubiert. Das Deckglas wurde schließlich auf einen Objektträger mit einem Tropfen

HEPES-gepufferte Glycerollösung (1:2 (vol/vol); pH 8,5) gebracht. Die Zellmonolayer wurden mit Hilfe eines Zeiss-510M-konfokalen Mikroskops (Jena, Deutschland) analysiert.

4.7 Immunpräzipitation

Vor Versuchsbeginn wurden 3 µg Anti-Insulinrezeptor Antikörper mit 200 µg an Protein-G-gekoppelten Magnetic Beads über Nacht bei 4 °C und unter ständiger Rotation inkubiert. Im Anschluss daran wurden sie dreimal mit 1xPBS mit Hilfe eines Magnetrührständers gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen, und bei 4 °C in 50 µl 1xPBS gelagert.

Konfluente RCEC-Monolayer wurden nach der Stimulation lysiert. Dazu wurden die Zellen auf Eis 10 min mit Lysispuffer (siehe 4.4) inkubiert, mit einem Gummischaber geerntet und danach mit Hilfe einer 26 G-Nadel und Insulinspritze durch mehrmaliges Aufziehen vollständig lysiert. Das Lysat wurde durch eine Zentrifugation (1.000 x g, 5 min, 4 °C) von unlysierten Zellen und Zellkernen getrennt. Anschließend wurde der Überstand mit IR-spezifischen Antikörpern, die an Protein-G-Magnetic Beads gekoppelt waren, über Nacht bei 4 °C unter Rotation inkubiert. Danach wurden die Beads dreimal mit 1xPBS (siehe 4.1.2) gewaschen, die gebundenen Proteine in Lysispuffer gelöst und gelelektrophoretisch mittels SDS-PAGE getrennt. Diese Proben wurden mit Hilfe von anti-Tyrosin pY20-Antikörpern im Westernblot analysiert.

4.8 Statistische Analysen

Angegeben sind der Mittelwert \pm S.D. von bis zu n = 6 Experimenten unabhängiger Zellpräparationen. Die statistische Auswertung wurde durchgeführt nach ANOVA in Verbindung mit dem Bonferoni-Test für post-hoc-Analyse. Wahrscheinlichkeitswerte (P) von < 0,05 wurden als signifikant angesehen.

5. Ergebnisse

5.1 Insulinrezeptoren und die endotheliale Permeabilität

Die Existenz endothelialer Insulinrezeptoren (IR) in HUVEC ist gut belegt (Zeng und Quon, 1996; Nitert et al., 2005). Die ersten Versuche dienten der Überprüfung, ob koronare mikrovaskuläre Endothelzellen der Ratte (RCEC) auch Insulinrezeptoren exprimieren. Mittels Immunpräzipitation mit anti-IR (29B4) und Westernblot-Analyse mit Anti-Phosphotyrosin (pY20)-Antikörper wurde die Präsenz und Aktivität (Phosphorylierung) des Insulinrezeptors (IR) ermittelt. Der IR war nach Stimulation mit Insulin phosphoryliert. Diese Phosphorylierung konnte mit Hilfe eines spezifischen, zellpermeablen Hemmstoffes der Insulinrezeptor-Tyrosinkinase, HNMP(AM)₃ (Saperstein et al., 1989; Diaz et al., 2007), inhibiert werden (Abbildung 1A).

IP = IR
WB = pY20

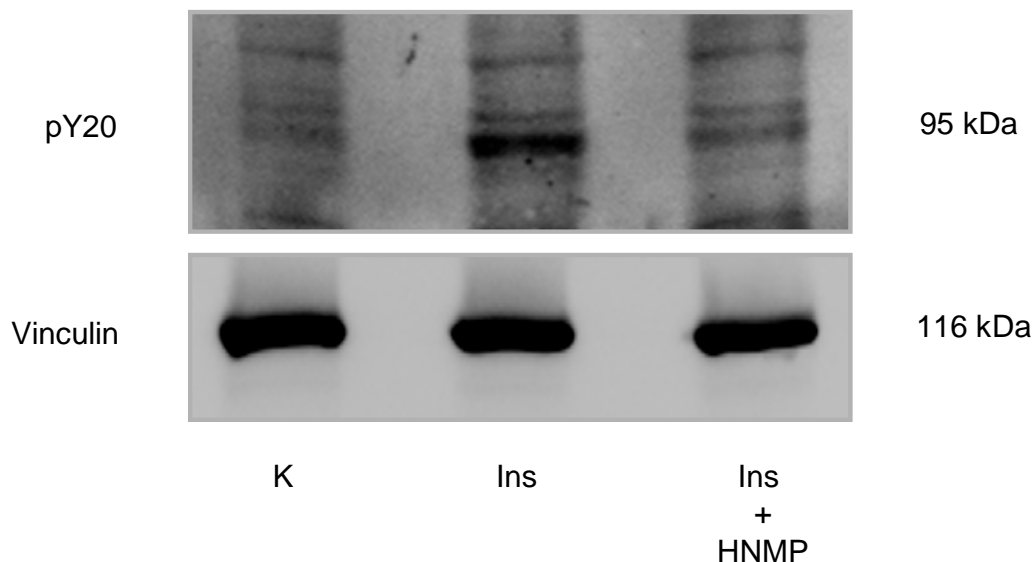


Abbildung 1A: Nachweis der Tyrosinphosphorylierung der IR- β -Untereinheit nach Immunpräzipitation. Stimulation der Zellen mit 1 IE/ml Insulin (Ins) und mit 1 IE/ml Insulin + 10 μ M Tyrosinkinasehemmstoff HNMP(AM)₃ (HNMP) für 10 min. Immunpräzipitation mit anti-IR (29B4) Antikörper und Westernblot-Analyse mittels Phosphotyrosin PY20-Antikörper. Vinculin im Gesamtzelllysat wurde als Beladungskontrolle verwendet.

Die Messung der Permeabilität von koronaren mikrovaskulären Endothelzell-Monolayern ergab unter unstimulierten Bedingungen eine konstante Albuminpermeabilität von annähernd $4,9 \pm 0,2 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$. Die Stimulation der Endothelzell-Monolayer mit Insulin führte zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme der Albuminpermeabilität. Die geringste signifikante Dosis war bei 0,001 IE/ml zu sehen, der größte Effekt zeigte sich bei einer Dosis von 1,0 IE/ml mit einer Reduktion der Albuminpermeabilität bis auf $3,4 \pm 0,3 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ (Abbildung 1B). Messungen mit 10 IE/ml Insulin ergaben keine zusätzliche Permeabilitätsabnahme gegenüber 1 IE/ml (Daten nicht gezeigt).

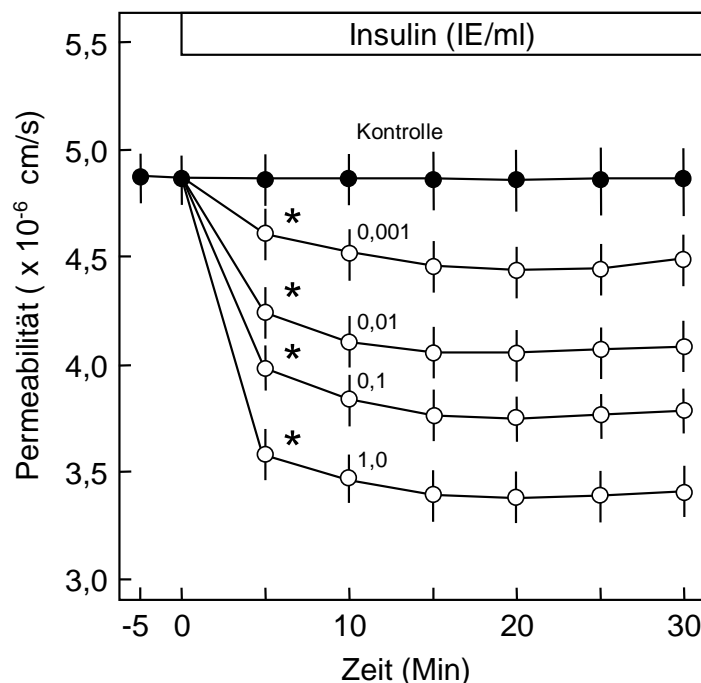


Abbildung 1B: Wirkung von Insulin in steigenden Konzentrationen (0,001 IE/ml – 1 IE/ml) auf die Albumin-Permeabilität von koronaren mikrovaskulären Endothelzellschichten. Mittelwerte \pm S.D., $n = 5$, Experimente unabhängiger Zellpräparationen. Zu den Zeitpunkten zwischen 5 und 30 min ist die Permeabilität signifikant verschieden. *, $P < 0,05$ versus Kontrolle.

5.2 MLC-Phosphorylierung und VE-Cadherin-Translokation durch Insulin

Die maßgeblichen Regulatoren der endothelialen Barriere sind der endotheliale kontraktile Apparat und die interendothelialen Adhäsionsstrukturen. Die Aktivität des kontraktiven Apparates wurde durch den Phosphorylierungsgrad der MLC bestimmt. Es konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass Insulin zu einer Dephosphorylierung der MLC führt (Abbildung 2A).

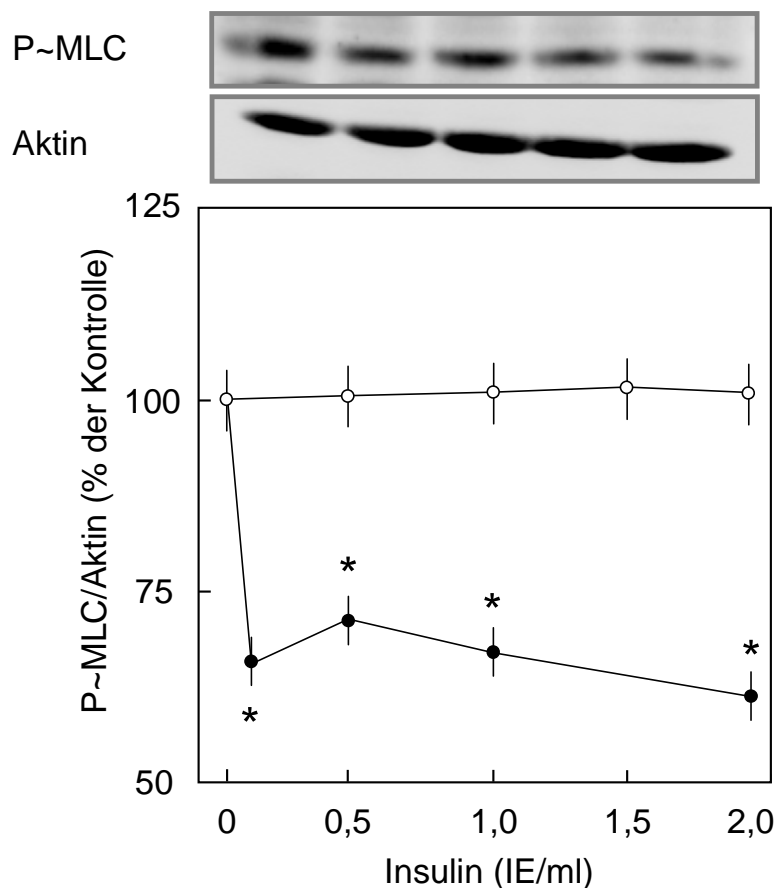


Abbildung 2A: Wirkung von Insulin in steigenden Konzentrationen (0,001 IE/ml – 2 IE/ml) auf die MLC-Phosphorylierung. Obere Abbildung: Repräsentativer Westernblot, Nachweis phosphorylierter MLC aus Zellhomogenaten. Untere Abbildung: Densitometrische Auswertung der Westernblot-Analysen. Mittelwerte \pm S.D., $n = 4$, Experimente unabhängiger Zellpräparationen. *, $P < 0,05$ versus Kontrolle.

Der Insulineffekt auf die MLC-Phosphorylierung erreicht bereits bei 0,1 IE/ml sein Maximum, wohingegen die Permeabilität in gleicher Konzentration noch nicht maximal reduziert war. Diese Dephosphorylierung der MLC kann nicht alleine den starken stabilisierenden Effekt des Insulins auf die endotheliale

Schranke erklären. Daher wurden in den folgenden Versuchen die interendothelialen Adhäsionsstrukturen untersucht. Die endotheliale Barriere wird vor allem durch occludens junctions und adherens junctions aufgebaut. Für die mechanische Stabilität zwischen Endothelzellen sind die adherens junctions verantwortlich. Das VE-Cadherin ist das spezifische Adhäsionsmolekül der Endothelzellen. Daher wurde mittels Immunhistochemie die Wirkung von Insulin auf die VE-Cadherine untersucht. Insulin induzierte eine Translokation der Cadherine an die Zellgrenzen und verstärkte damit die Zell-Zell-Kontakte (Abbildung 2B).

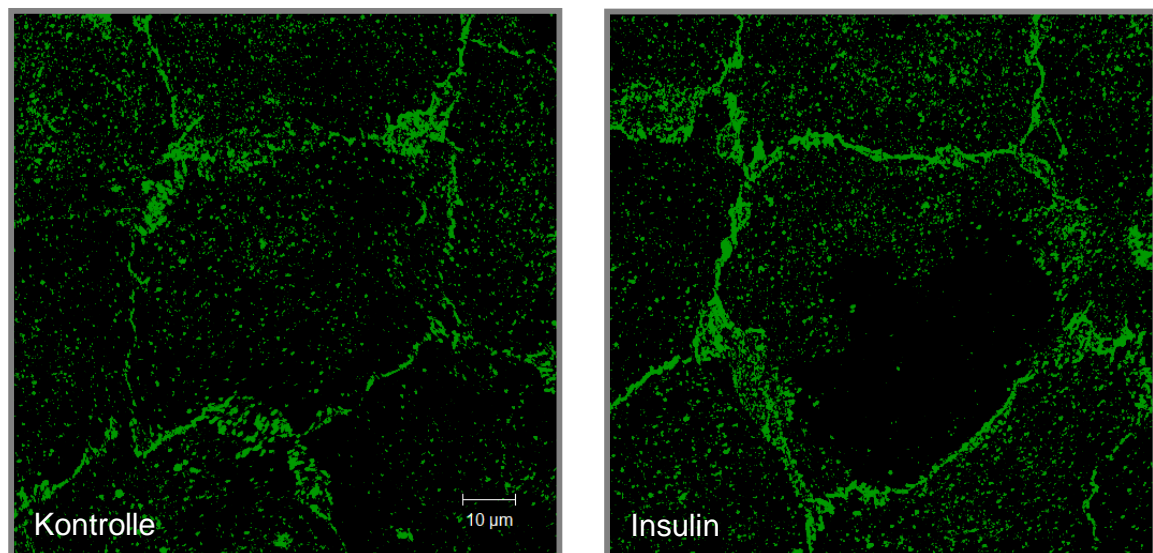


Abbildung 2B: Effekt von 1 IE/ml Insulin für 10 min auf die zelluläre Lokalisation von VE-Cadherin in endothelialen Monolayern. Insulin verstärkt VE-Cadherin an den Zellgrenzen. Mittelwerte \pm S.D., $n = 4$, Experimente unabhängiger Zellpräparationen. Bild eines repräsentativen Experimentes.

5.3 Rezeptor-vermittelte Wirkung des Insulins

Die intrazelluläre Domäne des Insulinrezeptors besteht unter anderem aus einer Tyrosinkinase. Um eine Rezeptor-abhängige, protektive Wirkung von Insulin zu demonstrieren, wurde diese durch Genistein, einem unspezifischen Tyrosinkinasehemmstoff, blockiert. Es zeigte sich, dass Genistein die Insulin-vermittelte Protektion der endothelialen Barriere signifikant reduzieren kann (Abbildung 3A).

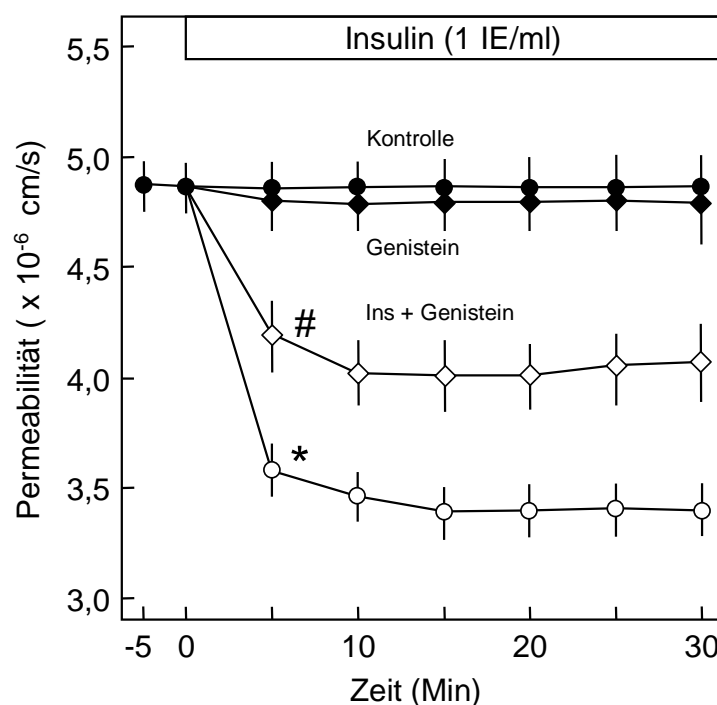


Abbildung 3A: Hemmung der Rezeptor-Tyrosinkinase mittels 10 μM Genistein. Nach 30-minütiger Vorinkubation Zugabe von 1 IE/ml Insulin (Ins). Mittelwerte \pm S.D., $n = 4$, Experimente unabhängiger Zellpräparationen. Zu den Zeitpunkten zwischen 5 und 30 min ist die Permeabilität signifikant verschieden. *, $P < 0,05$ versus Kontrolle, #, $P < 0,05$ versus 1 IE/ml Insulin.

In weiteren Versuchen wurde ein spezifischer Inhibitor der Insulinrezeptor-Tyrosinkinaseaktivität, HNMP(AM)₃ eingesetzt. Durch die Estergruppe des HNMP(AM)₃ ist diese zellpermeabel und kann an die intrazelluläre β -Untereinheit des Insulinrezeptors binden. Dies führt zu einer vollständigen Blockierung des Insulineffektes auf die Makromolekülpermeabilität und zeigt, dass die Stabilisierung der endothelialen Schranke durch Insulin über Insulinrezeptoren vermittelt wird (Abbildung 3B).

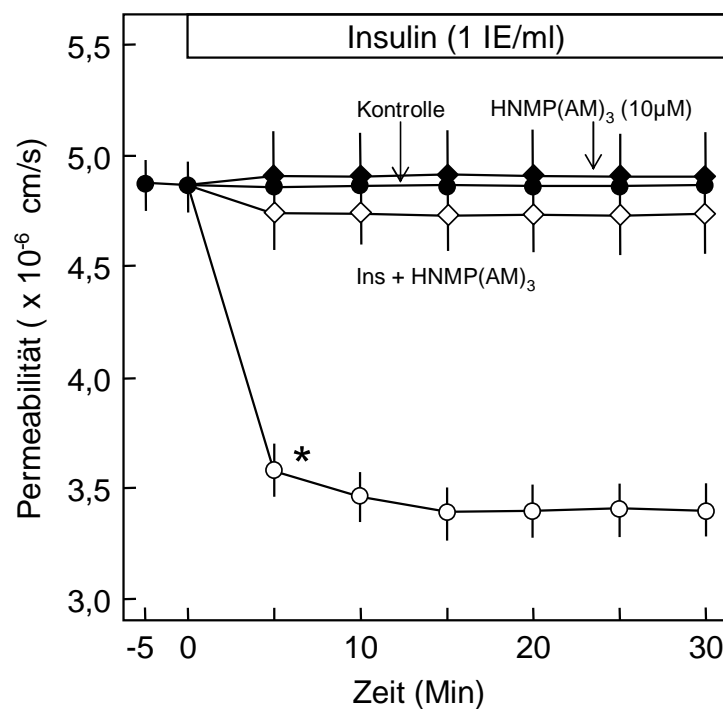


Abbildung 3B: Hemmung der Insulinrezeptor-Tyrosinkinase mittels 10 μ M HNMP(AM)₃. Nach 30-minütiger Vorinkubation Zugabe von 1 IE/ml Insulin (Ins). Vollständige Hemmung des Insulineffektes. Mittelwerte \pm S.D., $n = 4$, Experimente unabhängiger Zellpräparationen. Zu den Zeitpunkten zwischen 5 und 30 min ist die Permeabilität signifikant verschieden. *, $P < 0,05$ versus Kontrolle.

5.4 Wirkung von Insulin auf die Akt-Phosphorylierung

Es ist bekannt, dass eine Aktivierung von Insulinrezeptoren sowohl in endothelialen als auch in nicht-endothelialen Zellen zu einer Aktivierung der PI3K/Akt-Signalkaskade führt. Es wurde untersucht, ob Insulin auch die PI3K/Akt-Signalkaskade in koronaren mikrovaskulären Zellen aktiviert und ob diese Aktivierung eine Rolle bei der Insulin-vermittelten Barrierestabilisierung spielt. Die Phosphorylierung von Akt wurde als Maß für die Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges bestimmt. Insulin führt zu einer starken, signifikanten Akt-Phosphorylierung (Abbildung 4A). Diese Akt-Phosphorylierung ist sehr schnell und erreicht ihr Maximum bereits nach 5 min (Abbildung 4B).

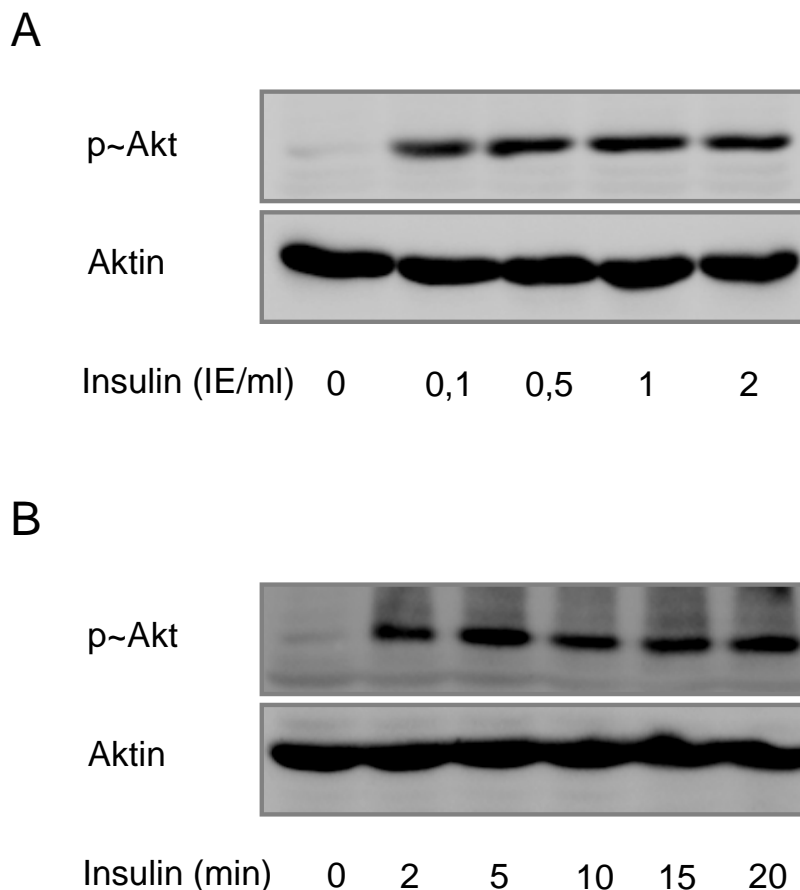


Abbildung 4A und 4B: Westernblot-Analyse der Akt-Phosphorylierung durch Insulin in koronaren mikrovaskulären Endothelzellen. Obere Abbildung: Konzentrationsabhängige Akt-Phosphorylierung. Untere Abbildung: zeitabhängige Akt-Phosphorylierung durch 1 IE/ml Insulin mit einem Maximum bei 5 min. Gel eines repräsentativen Experimentes.

Als nächster Schritt wurde der Effekt verschiedener Inhibitoren auf die Insulin-vermittelte Akt-Phosphorylierung untersucht. Durch Genistein, einen unspezifischen Tyrosinkinase-Inhibitor, konnte die Insulin-induzierte Akt-Phosphorylierung reduziert werden; HNMP(AM)₃, ein spezifischer Tyrosinkinase-Inhibitor, führt zu einer vollständigen Hemmung. Die strukturell unterschiedlichen PI3K-Inhibitoren Wortmannin und LY294002 führen ebenfalls zu einer nahezu vollständigen Hemmung der Akt-Phosphorylierung (Abbildung 4C).

C

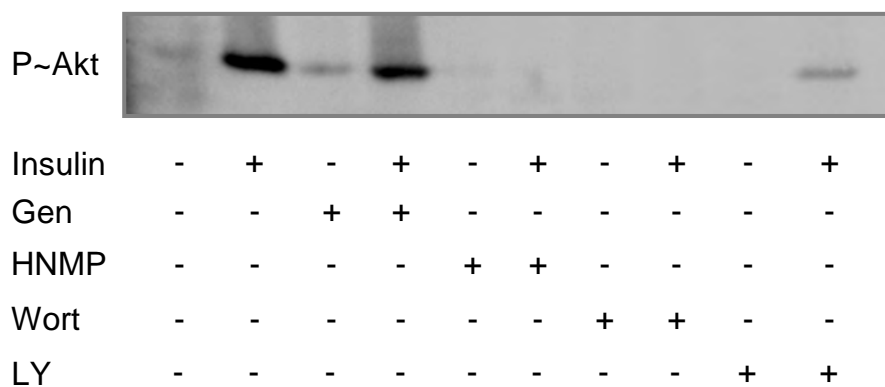


Abbildung 4C: Wirkung von 1 IE/ml Insulin, 10 μ M Genistein (Gen), 10 μ M HNMP(AM)₃ (HNMP), 1 μ M Wortmannin (Wort), 1 μ M LY294002 (LY) oder simultane Gabe mit Insulin auf die Akt-Phosphorylierung von koronaren mikrovaskulären Endothelzellen. Die Westernblot-Analyse der Akt-Phosphorylierung ergab eine Hemmung der Insulin-vermittelten Phosphorylierung durch die oben genannten Substanzen. Gel eines repräsentativen Experimentes.

Um die Rolle der Akt-Phosphorylierung bei der Insulin-induzierten Abnahme der Makromolekülpermeabilität zu untersuchen, wurde der Effekt des Insulins in Gegenwart eines PI3K-Inhibitors (Wortmannin) gemessen. Wortmannin hebt die Insulin-induzierte Abnahme der Makromolekülpermeabilität vollständig auf. Mit einem weiteren, strukturell unterschiedlichen PI3K-Inhibitor, LY294002, wurde eine partielle Hemmung erreicht (Abbildung 5).

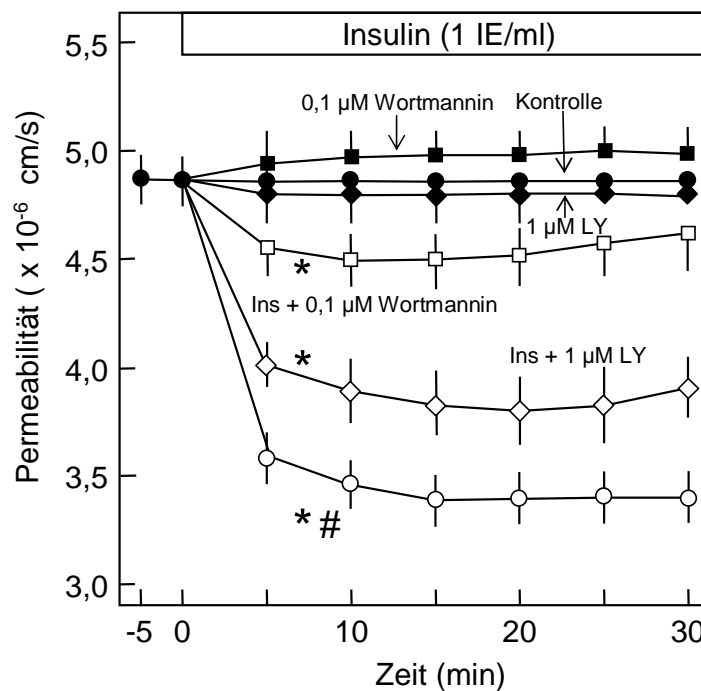


Abbildung 5: Hemmung des PI3K/Akt-Signalweges mittels 0,1 µM Wortmannin und 1 µM LY 294002. Nach 30-minütiger Inkubation der Endothelzellschicht Zugabe von 1 IE/ml Insulin. Durch Wortmannin vollständige, durch LY294002 teilweise Hemmung des Insulineffektes. Zu den Zeitpunkten zwischen 5 und 30 min ist die Permeabilität signifikant verschieden. Mittelwerte \pm S.D., $n = 4$, Experimente unabhängiger Zellpräparationen. *, $P < 0,05$ versus Kontrolle, #, $P < 0,05$ versus 1 IE/ml Insulin.

5.5 Wirkung von Insulin auf die endotheliale NO-Produktion

Da in verschiedenen Studien gezeigt wurde, dass eine Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges durch Insulin zu einer Aktivierung der endothelialen NO-Synthase führt, wurde überprüft, ob dies auch in mikrovaskulären Endothelzellen nachzuweisen ist. Mittels einer NO-Assay-Analyse (DAF-Methode) konnte eine konzentrationsabhängige NO-Freisetzung nach Stimulation der Endothelzellen mit Insulin bestimmt werden. Als Negativkontrolle wurde ein unspezifischer eNOS-Inhibitor (L-NAME) eingesetzt, der die NO-Freisetzung vollständig blockte (Abbildung 6A).

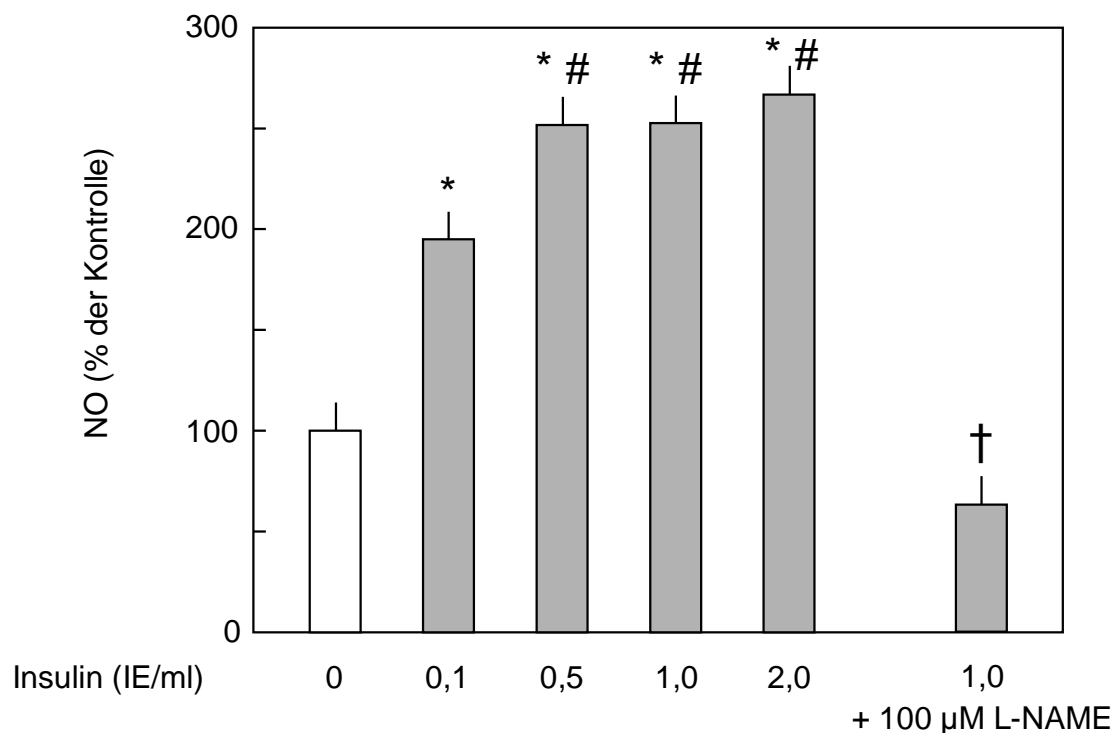


Abbildung 6A: NO-Assay-Analyse (DAF-Methode) nach einer Stimulation der koronaren mikrovaskulären Endothelzellen mit verschiedenen Insulinkonzentrationen. Insulin führt zu einer konzentrationsabhängigen Steigerung der NO-Produktion. Mittelwerte \pm S.D., $n = 4$, Experimente unabhängiger Zellpräparationen. *, $P < 0,05$ versus Kontrolle, #, $P < 0,05$ versus 0,1 IE/ml Insulin, †, $P < 0,05$ versus 0,1, 0,5, 1,0 und 2,0 IE/ml Insulin.

Im Folgenden wurde die Rolle von NO auf die Insulin-induzierte Protektion der endothelialen Schrankenfunktion analysiert. Es zeigte sich, dass die unspezifischen eNOS-Inhibitoren (100 μ M L-NAME und 100 μ M L-NNA) den schrankenstabilisierenden Effekt von Insulin reduzieren (Abbildung 6B).

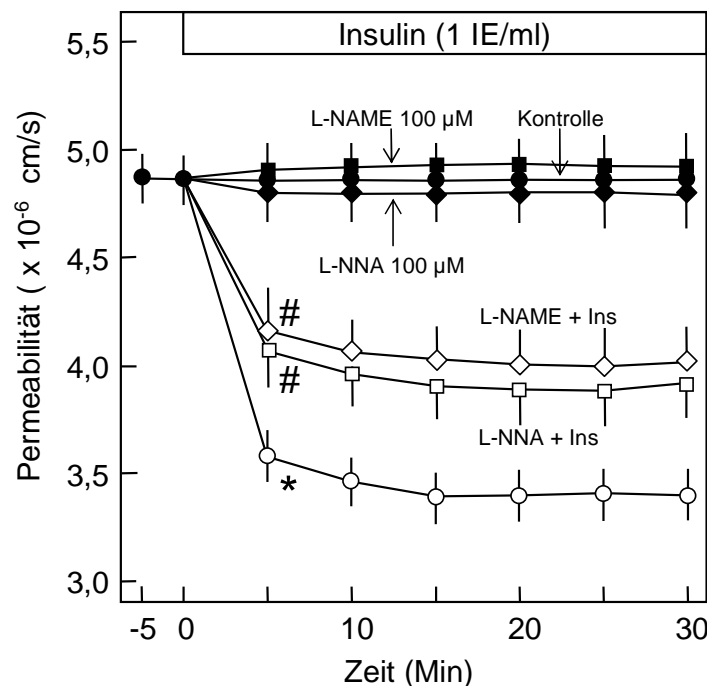


Abbildung 6B: Hemmung von eNOS. Die Endothelzellen wurden 30 min mit 100 μ M L-NAME oder 100 μ M L-NNA vorinkubiert. Anschließend wurde 1 IE/ml Insulin appliziert. Signifikante Reduktion der Permeabilitätsabnahme. Mittelwerte \pm S.D., $n = 4$, Experimente unabhängiger Zellpräparationen. Zu den Zeitpunkten zwischen 5 und 30 min ist die Permeabilität signifikant verschieden. *, $P < 0,05$ versus Kontrolle, #, $P < 0,05$ versus 1 IE/ml Insulin und Kontrolle.

Darüber hinaus wurde der Effekt von extrazellulärem NO durch die Stimulation der Endothelzellmonolayer mit NO-Donatoren (Spermine NONOate; 100 μ M) gemessen. NO führte zu einer geringen, aber signifikanten Reduktion der endothelialen Makromolekülpermeabilität (Daten nicht gezeigt).

5.6 Rac1-Aktivierung durch Insulin

Rho-GTPasen sind als Regulatoren der adherens junctions bekannt. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass Rac1 (ein wichtiges Mitglied der Rho-GTPasen) ein bedeutender Modulator der adherens junctions und damit der Schrankenstabilität ist. Hier wurde untersucht, ob Insulin in der Lage ist, Rac1 zu aktivieren. Es zeigte sich, dass Insulin eine dreifache Steigerung von Rac1 induziert, die vollständig von Insulinrezeptorinhibitoren und Wortmannin gehemmt werden konnte. Jedoch konnte der eNOS-Inhibitor L-NAME die Insulin-induzierte Rac1-Aktivierung nur teilweise hemmen (Abbildung 7A). Dies deutet darauf hin, dass Insulin sowohl NO-abhängig als auch NO-unabhängig (aber PI3K/Akt-abhängig) zu einer Aktivierung von Rac1 führt.

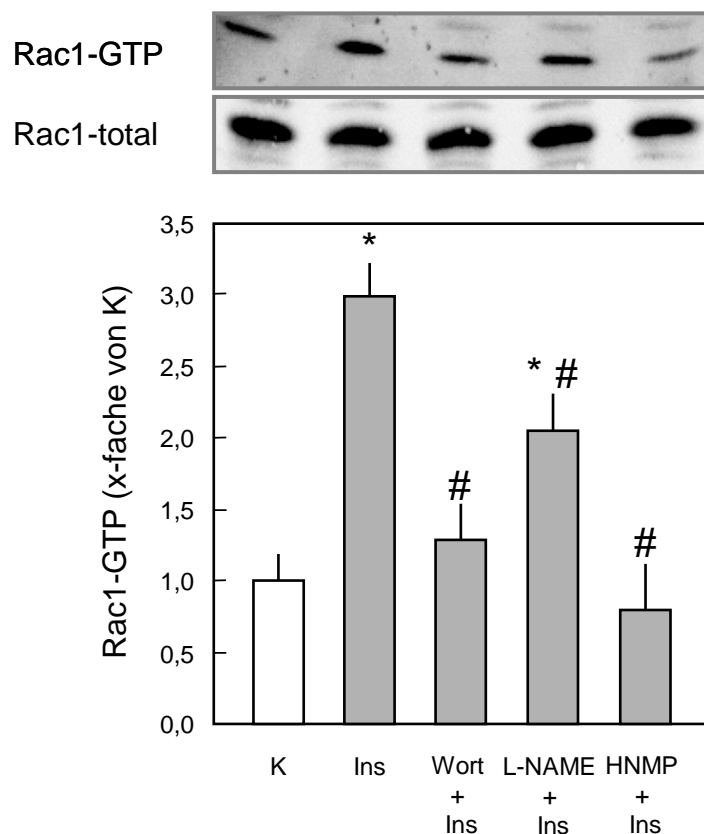


Abbildung 7A: Wirkung von 1 IE/ml Insulin (Ins), 1 μ M Wortmannin (Wort) + Insulin, 100 μ M L-NAME + Insulin und 10 μ M HMNP(AM)₃ (HNMP) + Insulin auf Rac1 der Endothelzellen. Nach 30-minütiger Inkubation mit den Inhibitoren wurde Insulin zugegeben. Obere Abbildung: Westernblot-Analyse des Rac1-Pull-down-Assays. Nachweis von aktiver Rac1 (Rac1-GTP, Pull-down) und Gesamt-Rac (Rac1-total) aus Zellhomogenaten. Gel eines repräsentativen Experimentes. Untere Abbildung: Densitometrische Auswertung des Westernblots. Mittelwerte \pm S.D., $n = 4$, Experimente unabhängiger Zellpräparationen. *, $P < 0,05$ versus Kontrolle, #, $P < 0,05$ versus 1 IE/ml Insulin.

Um die Auswirkung der Insulin-induzierten Rac1-Aktivierung auf die Makromolekülpermeabilität zu untersuchen, wurde ein spezifischer Rac1-Inhibitor (NSC23766, 100 μ M) eingesetzt. Die Inhibition von Rac1 führt zu einer vollständigen Aufhebung des protektiven Insulineffektes (Abbildung 7B), was die Beteiligung von Rac1 an der Insulin-vermittelten Schrankenstabilität bestätigt.

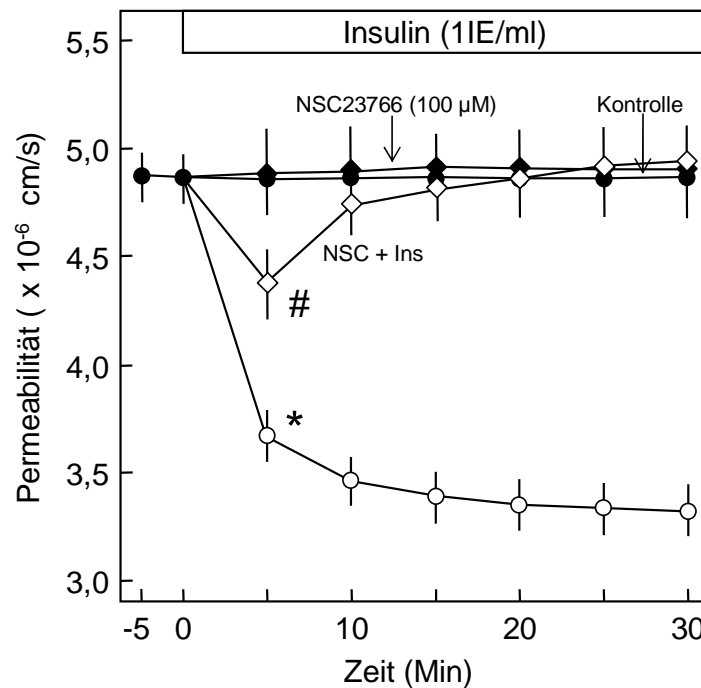


Abbildung 7B: Hemmung der Rac1 mittels 100 μ M NSC23766. Nach 30-minütiger Inkubation der Endothelzellschicht Zugabe von 1 IE/ml Insulin. Durch NSC23766 vollständige Hemmung des Insulineffektes. Zu den Zeitpunkten zwischen 5 und 30 min ist die Permeabilität signifikant verschieden. Mittelwerte \pm S.D., $n = 4$, Experimente unabhängiger Zellpräparationen. *, $P < 0,05$ versus Kontrolle, #, $P < 0,05$ versus 1 IE/ml Insulin.

6. Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit ist es, herauszufinden, über welchen Signaltransduktionsweg Insulin zu einer Abnahme der mikrovaskulären Endothelzellpermeabilität führt. Die wichtigsten Ergebnisse sind: (1) Insulin reduziert die Makromolekülpermeabilität von koronaren mikrovaskulären Endothelzellen; (2) die Insulin-vermittelte Schrankenstabilisierung erfolgt über eine PI3K/Akt-vermittelte Aktivierung von Rac1; (3) der Insulin-vermittelte Effekt ist teilweise von NO abhängig als auch unabhängig davon; (4) Inhibition von Rac1 hemmt die Insulin-vermittelte Stabilisierung der endothelialen Schranke.

Es wird häufig beschrieben, dass chronische Hyperglykämie eine Hauptursache der Atherosklerose und von mikrovaskulären Erkrankungen ist (Lawson et al., 2002; Kim et al., 2007; Hempel et al., 1997). Unlängst wurde sowohl in klinischen Studien als auch in Tierversuchen gezeigt, dass eine intensivierete Insulintherapie in inflammatorischen Prozessen einen protektiven Effekt hat (Jeschke et al., 2004; Hemmila et al., 2008). Dieser protektive Effekt ist nicht ausschließlich abhängig von der Insulin-vermittelten Glukoseaufnahme (Jeschke et al., 2004; Albacker et al., 2008). In den ersten Versuchen wurde mittels Konzentrationsreihen die optimale Insulinkonzentration ermittelt. Die geringste signifikante Dosis wurde bei 0,001 IE/ml, der größte Effekt bei 1 IE/ml gemessen. Unter physiologischen Bedingungen werden im menschlichen Körper 30 – 60 min postprandial Werte bis zu 100 µIE/ml erreicht. Unter Zellkulturbedingungen zeigte Insulin allerdings einen konzentrationsabhängigen protektiven Effekt, der sein Maximum bei einer Dosis von 1 IE/ml erreichte. Daher wurde in den folgenden Untersuchungen diese Konzentration eingesetzt.

Es wurde gezeigt, dass Insulin *in situ* die mikrovaskuläre endotheliale Ödembildung reduziert und die endotheliale Barriere vor oxidativem Schaden in kultivierten Endothelzellen schützt. Jedoch war der zu Grunde liegende Mechanismus der protektiven Insulinwirkung bisher nicht klar. Eine neuere Studie von Rath et al. (2006) zeigt, dass die Insulin-vermittelte endotheliale Barrierestabilisierung gegenüber oxidativem Schaden durch Akt-vermittelte NO-Produktion zustande kommt. Hier wurden aber keine potentiellen Schutzmechanismen beschrieben.

Endothelzellen bilden einen Monolayer und sind gegenseitig straff durch interzelluläre Adhäsionsstrukturen verbunden. VE-Cadherin ist ein bedeutendes Mitglied der Familie der adherens junctions und ist mit dem Aktinzytoskelett der Zelle verbunden. Das Aktinzytoskelett wiederum ist ein wichtiger Bestandteil des endothelialen kontraktiven Apparates, bestehend aus dem Aktin-Myosin-Komplex. Das Aktinzytoskelett übt einen großen Einfluss auf die Stabilität der Zell-Zell-Kontakte und daher auch auf die endotheliale Barrierenfunktion aus. Die Rho-Familie der GTPasen (vor allem RhoA, Rac1 und cdc42) sind bedeutende Regulatoren des Aktinzytoskelettes. Aktivierung von RhoA führt zu einer Steigerung der Aktin-Stressfasern und damit zu einer Aktivierung des kontraktiven Apparates. Dieser übt eine ziehende Kraft auf angrenzende Endothelzellen aus, was zu einer Abschwächung der adherens junctions führt und eine Zunahme interzellulärer Lücken mit sich bringt. Andererseits kontrolliert Rac1 das periphere Aktinzytoskelett und steigert die Stabilität der Zell-Zell-Kontakte durch die Translokation von VE-Cadherin an die Zellgrenzen. Von Gündüz et al. (2003 und 2006) wurden gezeigt, dass die Hemmung des endothelialen kontraktiven Apparates vor einer endothelialen Schrankendestabilisierung schützt, die durch Entzündungsmediatoren oder durch Ischämie und Reperfusion verursacht wurden. Die Aktivierung des endothelialen kontraktiven Apparates wird über den Phosphorylierungszustand der regulatorischen Myosin-Leicht-Kette (MLC) gesteuert. Eine Phosphorylierung der MLC durch die MLC-Kinase führt zu einer gesteigerten Aktin-Myosin-Interaktion und damit zu einer gesteigerten Kontraktion. Eine Dephosphorylierung der MLC durch die MLC-Phosphatase löst eine Relaxation aus.

In dieser Arbeit wurde herausgefunden, dass Insulin zu einer Dephosphorylierung der MLC führt und dadurch den kontraktiven Apparat inaktiviert. Der Insulineffekt auf die MLC-Dephosphorylierung erreicht bereits bei 0,1 IE/ml sein Maximum, wohingegen die Permeabilität in gleicher Konzentration noch nicht maximal reduziert war. Diese Dephosphorylierung der MLC kann daher nicht alleine den starken stabilisierenden Effekt des Insulins auf die endotheliale Barriere erklären. In anderen Versuchsreihen wurde gezeigt, dass eine Reduzierung der MLC-Phosphorylierung um 25 % kaum Auswirkung auf die Permeabilität hat. Daher wurden in weiteren Versuchen die interendothelialen Adhäsionsstrukturen untersucht. Dabei wurde gezeigt, dass es zu einer

Steigerung von VE-Cadherin an den Zell-Zell-Verbindungen kommt, was von einer Abnahme der Makromolekülpermeabilität begleitet wird. Der barrierenstabilisierende Effekt und die Verstärkung der adherens junctions durch Insulin kann unter anderem über eine Aktivierung von Rac1 vermittelt werden. Pull-Down-Experimente von aktiviertem Rac1 zeigten, dass Insulin zu einer Verdreifachung der Rac1-GTP-Bildung führt und dieser Effekt durch Insulinrezeptoren vermittelt wird. Durch eine Präinkubation mit einem spezifischen Insulinrezeptorhemmstoff, HNMP(AM)₃, ließ sich die Rac1-Aktivierung um 95 % hemmen. Dies zeigt, dass die Rac1-Aktivierung vollständig über den Insulinrezeptor vermittelt wird. In Übereinstimmung mit bisherigen Erkenntnissen in nichtendothelialen Zellen und HUVEC wurde festgestellt, dass Insulin auch in mikrovaskulären Endothelzellen den PI3K/Akt-Signalweg aktiviert und die NO-Produktion induziert. Durch eine Hemmung der PI3K konnte die Rac1-Aktivierung um 80 % reduziert werden. Experimente mit eNOS-Inhibitoren zeigten nur eine Reduktion um 50 % der Insulin-vermittelten Abnahme der Makromolekülpermeabilität. Dies war der Indikator dafür, dass es einen NO-unabhängigen Signalweg zur Barrierenstabilisierung geben muss (Wojciak-Stothard et al., 2005 und 2006). Da eine Aktivierung der Rac1 zu einer Verbesserung der endothelialen Barrierefunktion führt und sich auch in dieser Studie eine starke Aktivierung der Rac1 gezeigt hat, wurde untersucht, ob dieser Effekt durch eine Insulin-vermittelte NO-Produktion ausgelöst wird. Durch eine Präinkubation der Zellen mit eNOS-Inhibitoren wurde eine partielle Abnahme des Insulineffektes beobachtet, was die Hypothese eines NO-abhängigen wie auch NO-unabhängigen Signalweges bestätigte. Es könnte auch eine direkte Interaktion von PI3K und Rac1 stattfinden, wie es Kimberley et al. (1995) für Swiss 3T3- und COS7-Zellen beschrieben hat. Eine Hemmung der Rac1-Aktivierung mit einem spezifischen Inhibitor, NSC23766 (Gao et al., 2004), führte zu einer vollständigen Aufhebung des Insulin-vermittelten, schrankenstabilisierenden Effektes. Dies deutet daraufhin, dass dieser Effekt Rac1-abhängig ist.

Es ist bekannt, dass eine chronische Hyperglykämie eine Hauptursache der Atherosklerose und mikrovaskulären Erkrankungen ist und dass hohe Insulinkonzentrationen sich protektiv auf kardiovaskuläre Erkrankungen auswirken können. Neben den metabolischen Wirkungen wurde in verschiedenen

Studien gezeigt, dass eine gesteigerte Insulinkonzentration zu einer Zunahme der Durchblutung der Extremitäten und zu einer Abnahme des Gefäßwiderstandes führt (Baron et al., 1990; Scott et al., 2002; Vincent et al., 2006; Kelley et al., 1998). Diese Effekte erscheinen schon bei physiologischen Insulinkonzentrationen und nach einer relativ kurzen Zeit (30 - 60 min). Neben der vasodilatativen Wirkung von Insulin sind auch vasokonstriktorisches Effekte beschrieben worden. Diese Wirkung erfolgt über das sympathische Nervensystem und nach Freisetzung des Vasokonstriktors ET-1 aus dem Gefäßendothel (Anderson et al., 1991; Lembo et al., 1992; Rowe et al., 1981). Unter physiologischen Bedingungen ist der Einfluss des Insulins auf den Blutdruck gering, da sich die vasodilatatorischen und vasokonstriktorisches Wirkungen gegenseitig aufheben. Nur kurzfristig führt Insulin unter euglykämischen Bedingungen zu einer geringen Reduktion des arteriellen Blutdrucks (Baron et al., 1993).

Darüber hinaus steigert Insulin den myokardialen Blutfluss. Dies ist vor allem für Patienten beschrieben worden, die an Diabetes mellitus, arterieller Hypertonie, Hyperlipidämie, Adipositas und koronarer Herzkrankheit leiden (Sundell et al., 2002; McNulty et al., 2000; Rogers et al., 1977; Fath-Ordoubadi et al., 1997).

Verschiedene klinische und experimentelle Studien, die sich mit Ischämie/Reperfusion befassen haben, konnten zeigen, dass eine Insulingabe zum Zeitpunkt der Reperfusion vor dem myokardialen Reperfusionsschaden schützt (Ma et al., 2006). Dies konnte für isolierte Kardiomyozyten ebenfalls demonstriert werden (Abdallah et al., 2006). Diese Strategie geht auf das Behandlungsschema eines akuten Myokardinfarktes aus den 60er Jahren (Sodi-Pallares et al., 1962) und auf die Resultate der DIGAMI-1 Studie (Malmberg et al., 1995) zurück. Bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt, die einer frühen Glukose-Insulin-Kalium-Infusionstherapie zugeführt wurden, konnte die Mortalität im Krankenhaus signifikant gesenkt werden. Aktuelle Studien zeigen, dass bei Patienten, die mehr als drei Tage Betreuung auf der Intensivstation benötigen, durch eine intensive Insulintherapie die Mortalität von 52,5 % auf 43 % gesenkt werden konnte (Van den Berghe et al., 2006).

So berichteten auch Sasaki et al. (2006) von einer Reduktion des venösen Leakage bei Ratten nach Insulingabe. Rath et al. (2006) zeigten in Endothelzellen

aus der Aorta, dass Insulin die endotheliale Barriere vor oxidativem Schaden schützt.

Das Ergebnis dieser Arbeit zeigt, dass Insulin die endotheliale Makromolekülpermeabilität durch Verstärkung der adherens junctions reduziert. Dieser Effekt wird durch eine PI3K/Akt-induzierte Aktivierung von Rac1 vermittelt. Die Aktivierung von Rac1 ist dabei vollständig Insulinrezeptor-vermittelt und nur teilweise NO-abhängig, aber sie ist in jedem Fall abhängig von einer Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges.

7. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Auswirkung des Insulins auf die Stabilität der endothelialen Barriere untersucht. Gefäßendothelzellen bilden als einlagige Zellschicht die luminale Oberfläche des gesamten Blutgefäßsystems. Insulin ist an einer Vielzahl von physiologischen Prozessen beteiligt, wie z. B. bei der Regulation der Permeabilität, des Vasotonus und der Hämostase. Insulin ist ein lebenswichtiges Peptidhormon, das neben seinen metabolischen Funktionen auch vasoaktive Wirkungen hat. So führt eine gesteigerte Insulinkonzentration zu einer Zunahme der Durchblutung der Extremitäten und zu einer Abnahme des Gefäßwiderstandes. Die Stabilität der endothelialen Barriere wird über den kontraktilem Apparat, bestehend aus dem Aktin-Myosin-Komplex, und über Zell-Zell-Kontakte reguliert.

In kultivierten koronaren mikrovaskulären Zellen der Ratte (RCEC) wurden in einem ersten Schritt Insulinrezeptoren nachgewiesen. Des Weiteren wurden die VE-Cadherin-Translokation, MLC-Phosphorylierung, Makromolekülpermeabilität, NO-Freisetzung, Akt- und Rac1-Aktivität unter Einfluss von Insulin untersucht.

Insulin führt zu einer MLC-Dephosphorylierung und VE-Cadherin-Translokation an die Zellgrenzen, was von einer signifikanten, konzentrationsabhängigen Abnahme der Makromolekülpermeabilität begleitet wird. Der maximale Effekt wurde bei 1 IE/ml Insulin erreicht. Dieser protektive Effekt auf die Makromolekülpermeabilität kann durch Genistein (Tyrosinkinase-Inhibitor) und HNMP(AM)₃ (spezifischer Hemmstoff der Insulinrezeptor-Tyrosinkinase) vollständig gehemmt werden und zeigt damit, dass der Insulineffekt über den Insulinrezeptor vermittelt wird. Des Weiteren induziert Insulin die Aktivierung von Akt und Rac1. Diese Effekte konnten durch einen Rac1-Inhibitor (NSC23766) und Wortmannin (PI3K-Inhibitor) vollständig sowie mit L-NAME (eNOS-Inhibitor) teilweise gehemmt werden. Zusammenfassend stabilisiert Insulin Rezeptor-vermittelt die endotheliale Schrankenfunktion über PI3K/Akt-vermittelte Rac1-Aktivierung.

In Zukunft könnten durch Verständnis dieses Signaltransduktionsweges neue therapeutische Strategien entwickelt werden, die vor einem Versagen der endothelialen Barriere schützen.

8. Summary

In this thesis the effect of insulin on the endothelial barrier stability was tested. Endothelial cells form as a single-layer cell coat the luminal surface of the blood vessels. It is involved in a multiplicity of physiological processes like the regulation of permeability, vasotonus and hemostasis. Insulin is an essential hormone with vasoactive actions beside its metabolic functions. The increase of the insulin concentration causes an increase of blood flow in the extremities and a reduction of the vessel resistance. The endothelial barrier function is regulated via the contractile machinery, consisting of the actin-myosin complex, and cell-cell adhesions.

First of all, the existence of insulin receptors was tested in cultured rat coronary endothelial cells (RCEC). Furthermore the VE-cadherin translocation, MLC phosphorylation, macromolecule permeability, NO release, Akt- and Rac1-activity were analyzed under the influence of insulin. Insulin induces a dephosphorylation of the MLC and a VE-cadherin translocation to the cell borders, which is accompanied by a significant concentration dependent reduction of the macromolecule permeability.

The maximal effect was achieved with 1 IU/ml insulin. This protective effect on permeability could be blocked by genistein (tyrosine kinase inhibitor), and HNMP(AM)₃ (insulin receptor kinase inhibitor), suggesting that the effect of insulin is receptor mediated. Furthermore, insulin induced the activation of Akt and Rac1. These effects could be blocked entirely by NSC23766 (Rac1 inhibitor) and wortmannin (PI3K inhibitor), and partially by L-NAME (eNOS inhibitor). In conclusion, insulin stabilizes receptor-mediated the endothelial barrier function via PI3K/Akt mediated Rac1 activation.

In the future, other agents may be identified, which use this signal transduction mechanism for therapeutic approaches to the capillary leakage syndrome.

9. Literaturverzeichnis

1. **Abdallah Y, Gkatzoflia A, Gligorievski D, Kasseckert S, Euler G, Schlüter KD, Schäfer M, Piper HM, Schäfer C.** Insulin protects cardiomyocytes against reoxygenation-induced hypercontracture by a survival pathway targeting SR Ca²⁺ storage. *Cardiovasc Res* 2006 May 1;70(2):346-53.
2. **Albacker T, Carvalho G, Schricker T, Lachapelle K.** High-dose insulin therapy attenuates systemic inflammatory response in coronary artery bypass grafting patients. *Ann Thorac Surg* 2008 Jul;86(1):20-7.
3. **Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB, Cohen P.** Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B α . *Curr Biol* 1997 Apr;7:261-269.
4. **Ammon HPT, Häring HU, Kellerer M, Laube H, Mark M.** Mechanismen der Insulinsekretion. In: Ammon, H.P.T., Antidiabetika. *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart* 2000, S.119-132.
5. **Anderson EA, Hoffman RP, Balon TW, Sinkey CA, Mark AL.** Hyperinsulinemia produces both sympathetic neural activation and vasodilation in normal humans. *J Clin Invest* 1991 Jun;87:2246-2252.
6. **Augustin HG, Kozian DH, Johnson RC.** Differentiation of endothelial cells: Analysis of the constitutive and activated endothelial cell phenotypes. *Bioassays* 1994 Dec;16:901-906.
7. **Bagrodia S, Cerione RA.** PAK to the future. *Trends Cell Biol* 1999 Sep;9:350-355.
8. **Baldwin AL, Thurston G.** Mechanics of endothelial cell architecture and vascular permeability. *Crit Rev Biomed Eng* 2001;29(2):247-78.
9. **Banting FG, Best CH, MacLeod JJR.** The internal secretion of the pancreas. *Am J Physiol* 1922;59:479.
10. **Baron AD, Laakso M, Brechtel G, Hoit B, Watt C, Edelman SV.** Reduced postprandial skeletal muscle blood flow contributes to glucose intolerance in human obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 1990 Jun;70(6):1525-33.
11. **Baron AD, Brechtel G.** Insulin differentially regulates systemic and skeletal muscle vascular resistance. *Am J Physiol* 1993 Jul;265:61-67.

12. **Bar RS, Boes M.** Distinct receptors for IGF-I, IGF-II, and insulin are present on bovine capillary endothelial cells and large vessel endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res Commun* 1984 Oct;124:203-209.
13. **Baron AD, Laakso M, Brechtel G, Hoit B, Watt C, Edelman SV.** Reduced postprandial skeletal muscle blood flow contributes to glucose intolerance in human obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 1990 Jun;70:1525-1533.
14. **Bassenge E.** Endothelial function in different organs. *Prog Cardiovasc Dis* 1996 Nov-Dec;39:209-228.
15. **Bazzoni G, Dejana E.** Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol Rev* 2004 Jul;84:869-901.
16. **Bishop AL and Hall A.** Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J* 2000 Jun;348:241-255.
17. **Blum MS, Toninelli E, Anderson JM, Balda MS, Zhou J, O'Donnell L, Pardi R, Bender JR.** Cytoskeletal rearrangement mediates human microvascular endothelial tight junction modulation by cytokines. *Am J Physiol* 1997 Jul;273:286-94.
18. **Carter RD, Joyner WL, Renkin EM.** Effect of histamine and some other substances on molecular selectivity of the capillary wall to plasma proteins and dextran. *Microvas Res* 1974 Jan;16:297-303.
19. **Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, Pober JS, Wick TM, Konkle BA, Schwartz BS, Barnathan ES, McCrae KR, Hug BA, Schmidt AM, Stern DM.** Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 1998 May 15;91(10):3527-61.
20. **Corada M, Liao F, Lindgren M, Lampugnani MG, Breviario F, Frank R, Muller WA, Hicklin DJ, Bohlen P, Dejana E.** Monoclonal antibodies directed to different regions of vascular endothelial cadherin extracellular domain affect adhesion and clustering of the protein and modulate endothelial permeability. *Blood* 2001 Mar;97:1679-84.
21. **Corada M, Mariotti M, Thurston G, Smith K, Kunkel R, Brockhaus M, Lampugnani MG, Martin-Padura I, Stoppacciaro A, Ruco L, McDonald DM, Ward PA, Dejana E.** Vascular endothelial-cadherin is an important determinant of microvascular integrity in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999 Aug;96:9815-20.
22. **Cotran RS.** American association of pathologists president's address. New roles for the endothelium in inflammation and immunity. *Am J Pathol* 1987 Dec;129:407-413.

23. **Davignon J, Ganz P.** Role of Endothelial Dysfunction in Atherosclerosis. *Circulation* 2004 Jun 15;109(23 Suppl 1):III27-32.
24. **Dejana E, Bazzoni G, Lampugnani MG.** Vascular endothelial (VE)-cadherin: only an intercellular glue? *Exp Cell Res* 1999 Oct;252:13-9.
25. **Dejana E, Corada M, Lampugnani MG.** Endothelial cell-to-cell junctions. *Faseb J* 1995 Jul;9(10):910-8.
26. **Diaz LE, Chaun YC, Lewitt M, Fernandez-Perez L, Carrasco-Rodriguez S, Sachez-Gomez M, Flores-Morales A.** IGF-II regulates metastatic properties of choriocarcinoma cells through the activation of the insulin receptor. *Mol Hum Reprod* 2007 Aug;13(8):567-76.
27. **Drenckhahn, D.** Zellenlehre. In Benninghoff-Drenckhahn Anatomie Band 1, Urban& Fischer, München/Jena, 2003, 16. Auflage.
28. **Etienne-Manneville S, Hall, A.** Rho GTPases in cell biology. *Nature* 2002 Dec;420:629-635.
29. **Fath-Ordoubadi F, Beatt KJ.** Glucose–insulin–potassium therapy for treatment of acute myocardial infarction: an overview of randomized placebo-controlled trials. *Circulation* 1997 Aug;19;96(4):1152-6.
30. **Feron O, Dessy C, Moniotte S, Desager JP, Balligand JL.** Hypercholesterolemia decreases nitric oxide production by promoting the interaction of caveolin and endothelial nitric oxide synthase. *J Clin Invest* 1999 Mar;103:897-905.
31. **Formoso G, Chen H, Kim JA, Montagnani M, Consoli A, Quon MJ.** Dehydroepiandrosterone mimics acute actions of insulin to stimulate production of both nitric oxide and endothelin 1 via distinct phosphatidylinositol 3-kinase- and mitogen-activated protein kinase-dependent pathways in vascular endothelium. *Mol Endocrinol* 2006 May;20(5):1153-63. Epub 2005 Dec 22.
32. **Frame S, Cohen P.** GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery, *Biochem J* 2001 Oct;359:1-16.
33. **Furchgott RF, Zawadzki JV.** The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980 Nov;288:373-376.
34. **Gao Y, Dickerson JB, Guo F, Zheng J, Zheng Y.** Rational design and characterization of a Rac GTPase-specific small molecule inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004 May 18;101(20):7618-23.
35. **Garcia JG, Davis HW, Patterson CE.** Regulation of endothelial cell gap formation and barrier dysfunction: role of myosin light chain phosphorylation. *J Cell. Physiol* 1995 Jun;163,510-522.

36. **Gimbrone A, Topper JN:** Biology of the vessel wall: endothelium. In: Chien KR (ed). *Molecular Basis of Cardiovascular Disease*. W. B. Saunders, Philadelphia, 1999;331-48.
37. **Goeckeler ZM, Wysolmerski RB.** Myosin light chain kinase regulated endothelial cell contraction: the relationship between isometric tension, actin polymerization, and myosin phosphorylation. *J. Cell Biol* 1995 Aug;130:613-627.
38. **Gotsch U, Borges E, Bosse R, Böggemeyer R, Simon M, Mossmann H, Vestweber D.** VE-cadherin antibody accelerates neutrophil recruitment in vivo. *J Cell Sci* 1997 Mar;110 (Pt 5):583-588.
39. **Gulino D, Delachanal E, Concord E, Genoux Y, Morand B, Valiron MO, Sulpice E, Scaife R, Alemany M, Vernet T.** Alteration of endothelial cell monolayer integrity triggers resynthesis of vascular endothelium cadherin. *J Biol Chem* 1998 Nov;273:29786-93.
40. **Gündüz D, Kasseckert SA, Härtel FV, Aslam M, Abdallah Y, Schäfer M, Piper HM, Noll T, Schäfer C.** Accumulation of extracellular ATP protects against acute reperfusion injury in rat heart endothelial cells. *Cardiovasc Res* 2006 Sep 1;71(4):764-73.
41. **Gündüz D, Hirche F, Härtel FV, Rodewald CW, Schäfer M, Pfitzer G, Piper HM, Noll T.** ATP antagonism of thrombin-induced endothelial barrier permeability. *Cardiovasc Res* 2003 Aug 1;59(2):470-8.
42. **Hamilton CA, Brosnan MJ, McIntyre M, Graham D, Dominiczak AF.** Superoxide Excess in Hypertension and Aging. A Common Cause of Endothelial Dysfunction. *Hypertens* 2001 Feb;37(2):529-534.
43. **Haselton FR, Dworska E, Evans SS, Hoffman LH, Alexander JS.** Modulation of retinal endothelial barrier in an in vitro model of the retinal microvasculature. *Exp Eye Res* 1996 Aug;63:211-22.
44. **Hecker M.** Pathophysiologie der koronaren Endothelfunktion. In: *Autonomes Nervensystem und Koronare Herzkrankheit*. Griebenow R., Gülker H., Dominiak P., Piper H.M. (Hrsg). Novartis Pharma GmbH 1999, Nürnberg: 65-86.
45. **Hemmila MR, Taddonio MA, Arbabi S, Maggio PM, Wahl WL.** Intensive insulin therapy is associated with reduced infectious complications in burn patients. *Surgery* 2008 Oct;144(4):629-35.
46. **Hempel A, Maasch C, Heintze U, Lindschau CR, Dietz R, Luft FC, Haller H.** High glucose concentrations increase endothelial cell permeability via activation of protein kinase C alpha. *Circ Res* 1997 Sep;81(3):363-71.

47. **Hink U, Li H, Mollnau H, Oelze M, Matheis E, Hartmann M, Skatchkov M, Thaiss F, Stahl RAK, Warnholtz A, Meinertz T, Griendling K, Harrison DG, Förstermann U, Münzel T.** Mechanisms Underlying Endothelial Dysfunction in Diabetes Mellitus. *Circ Res* 2001 Feb 2;88(2):14-22.
48. **Hixenbaugh EA, Goeckeler ZM, Papaiya NN, Wysolmerski RB, Silverstein SC, Huang AJ.** Stimulated neutrophils induce myosin light chain phosphorylation and isometric tension in endothelial cells. *Am. J. Physiol* 1997 Aug;273:981-988.
49. **Jaffe AB, Hall A.** Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2005;21:247-69.
50. **Jeschke MG, Klein D, Bolder U, Einspanier R.** Insulin attenuates the systemic inflammatory response in endotoxemic rats. *Endocrinolog.* 2004 Sep;145(9):4084-93.
51. **Jeschke MG, Klein D, Herndon DN.** Insulin treatment improves the systemic inflammatory reaction to severe trauma. *Ann Surg* 2004 April;239(4):553-60.
52. **Kahn CR.** The molecular mechanism of insulin action. *Annu Rev Med* 1985;36:429-51.
53. **Kelley D, Mitrakou A, Marsh H, Schwenk F, Benn J, Sonnenberg G, Arcangeli M, Aoki T, Sorensen J, Berger M, Sonksen P, Gerich J.** Skeletal muscle glycolysis, oxidation, and storage of an oral glucose load. *J Clin Invest* 1988 May;81:1563-1571.
54. **Khan AH, Pessin JE.** Insulin regulation of glucose uptake: a complex interplay of intracellular signalling pathways, *Diabetologia* 2002 Nov;45:1475-1483.
55. **Kim YH, Choi MY, Kim YS, Park CH, Lee JH, Chung IY, Yoo JM, Choi WS, Cho GJ, Kang SS.** Triamcinolone acetonide protects the rat retina from STZ-induced acute inflammation and early vascular leakage. *Life Sci* 2007 Sep 15;81(14):1167-73.
56. **Kimberley FT, Lewis CC, Carpenter CL.** Rho Family GTPases Bind to Phosphoinositide Kinases. *J Biol Chem* 1995 Jun, 270:17656-59.
57. **Kurose I, Wolf R, Grisham MB, Granger DN.** Modulation of Ischemia/Reperfusion-Induced Microvascular Dysfunction by Nitric Oxide. *Circ Res* 1994 Mar;74:376-382.
58. **Laemmli UK.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970 Aug;227(5259):680-685.

59. **Lawson S, Ward DT, Conner C, Gallagher C, Tsokos G, Shea-Donohue T.** Diabetic hyperglycemia: a facilitating factor in systemic capillary leak. *J Surg Res* 2002 Jun 15;105(2):95-101.
60. **Lembo G, Napoli R, Capaldo B, Rendina V, Iaccarino G, Volpe M, Trimarco B, Sacca L.** Abnormal sympathetic overactivity evoked by insulin in the skeletal muscle of patients with essential hypertension. *J Clin Invest* 1992 Jul;90:24-29.
61. **Lum H, Malik AB.** Mechanisms of increased endothelial permeability. *Can J Physiol Pharmacol* 1996 Jul;74(7):787-800.
62. **Ma H, Zhang HF, Zhang QJ, Li J, Huo JH, Li X, Guo WY, Wang HC, Gao F.** Vasculoprotective effect of insulin in the ischemic/reperfused canine heart: role of Akt-stimulated NO production. *Cardiovasc Res* 2006 Jan;69(1):57-65.
63. **Majon G.** Ultrastructure of the vascular membrane. In: Handbook of Physiology. Sect. 2 Vol. II (W.F. Hamilton, P. Dow, Hrg.), *American Physiological Society*, Washington 1963;1035-1073.
64. **Majon G, Palade GE.** Studies on inflammation. 1. The effect of histamine and serotonin on vascular permeability: an electron microscopic study. *J. Biophys Biochem Cytol* 1961 Dec;11:571-605.
65. **Malmberg K, Ryden L, Efendic S, Herlitz J, Nicol P, Waldenström A, Wedel H, Welin L.** Randomized trial of insulin-glucose infusion followed by subcutaneous insulin treatment in diabetic patients with acute myocardial infarction (DIGAMI study): effects on mortality at 1 year. *J Am Coll Cardiol.* 1995 Jul;26(1):57-65.
66. **Marasciulo FL, Montagnani M, Potenza MA.** Endothelin-1: the yin and yang on vascular function. *Curr Med Chem* 2006;13:1655-1665.
67. **McNulty PH, Pfau S, and Deckelbaum LI.** Effect of plasma insulin level on myocardial blood flow and its mechanism of action. *Am J Cardiol* 2000 Jan;85:161-165.
68. **Montagnani M, Chen H, Barr VA, Quon MJ.** Insulin-stimulated activation of eNOS is independent of Ca^{2+} but requires phosphorylation by Akt at Ser1179. *J Biol Chem* 2001 Aug;276:30392-30398.
69. **Montagnani M, Ravichandran LV, Chen H, Esposito DL, Quon MJ.** Insulin receptor substrate-1 and phosphoinositide-dependent kinase-1 are required for insulin-stimulated production of nitric oxide in endothelial cells. *Mol Endocrinol* 2002 Aug;16:1931-1942.
70. **Moy AB, Shasby SS, Scott BD, Shasby DM.** The effect of histamine and cyclic adenosine monophosphate on myosin light chain phosphorylation in human umbilical vein endothelial cells. *J. Clin Invest* 1993 Sep;92:1198-1206.

71. **Muhs A, Noll T, Piper HM.** Vinculin phosphorylation and barrier failure of coronary endothelial monolayers under energy depletion. *Am J Physiol* 1997 Aug;273:608-617.
72. **Nawroth P, Lasch HG.** *Vaskuläre Medizin systematisch.* UNI-MED Verlag AG, Bremen 1999.
73. **Nitert MD, Chisalita SI, Olsson K, Bornfeldt KE, Arnqvist HJ.** IGF-I/insulin hybrid receptors in human endothelial cells. *Mol Cell Endocrinol* 2005 Jan 14;229(1-2):31-7.
74. **Noll T, Muhs A, Besselmann M, Watanabe H, and Piper HM.** Initiation of hyperpermeability in energy-depleted coronary endothelial monolayers. *Am J Physiol* 1995 Apr;268(4 Pt 2):1462-70.
75. **Nystrom FH, Quon MJ.** Insulin signalling: metabolic pathways and mechanisms for specificity. *Cell Signal* 1999 Aug;11(8):563-74.
76. **Oemar BS, Tschudi MR, Godoy N, Brovkovich V, Malinski T, Lüscher TF.** Reduced endothelial nitric oxide synthase expression and production in human atherosclerosis. *Circulation* 1998 Jun 30;97(25):2494-8.
77. **Rath S, Kalogeris T, Mai N, Zibari G, Alexander J, Lefer D, Turnage RH.** Insulin prevents oxidant-induced endothelial cell barrier dysfunction via nitric oxide-dependent pathway. *Surgery* 2006 Jan;139(1):82-91.
78. **Ridley AJ.** Rho proteins: linking signaling with membrane trafficking. *Traffic* 2001a May;2:303-10.
79. **Ridley AJ.** Rho GTPases and cell migration. *J Cell Sci* 2001b Aug;114:2713-22.
80. **Rogers WJ, Russell, Jr. RO, McDaniel HG, and Rackley CE.** Acute effects of glucose–insulin–potassium infusion on myocardial substrates, coronary blood flow and oxygen consumption in man. *Am J Cardiol* 1977 Sep;40(3):421-8.
81. **Rosen OM.** After insulin binds. *Science* 1987 Sep;18:237(4821):1452-8.
82. **Ross R, Glomset JA.** The pathogenesis of atherosclerosis (first of two parts). *N Engl J Med* 1976 Aug;295:369-77.
83. **Ross R, Glomset JA.** The pathogenesis of atherosclerosis (second of two parts). *N Engl J Med* 1976 Aug;295:420-5.
84. **Rowe JW, Young JB, Minaker KL, Stevens AL, Pallotta J, Landsberg L.** Effect of insulin and glucose infusions on sympathetic nervous system activity in normal man. *Diabetes* 1981 Mar;30:219-225.

85. **Predescu D, Palade GE.** Plasmalement vesicles represent the large pore system of continuous microvascular endothelium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1993 Aug;265 (2 PT 2):725-733.
86. **Saperstein R, Vicario PP, Strout HV, Brady E, Slater EE, Greenlee WJ, Ondeyka DL, Patchett AA, Hangauer DG.** Design of a selective insulin receptor tyrosine kinase inhibitor and its effect on glucose uptake and metabolism in intact cells. *Biochemistry* 1989 Jun 27;28(13):5694-701.
87. **Sasaki R, Whitt SP, Huxley VH.** Permeability response of the rat mesenteric microvasculature to insulin. *Clin Hemorheol Microcirc* 2006;34(1-2):259-63.
88. **Scherrer U, Vollenweider P, Randin D, Jequier E, Nicod E, Tappy L.** Suppression of insulin-induced sympathetic activation and vasodilation by dexamethasone in humans. *Circulation* 1993 Aug;88(2):388-94.
89. **Schmidt RF, Thews G, Lang F.** Physiologie des Menschen. *Springer-Verlag*. 28. Auflage 2000. S.514-521.
90. **Schnittler HJ, Wilke A, Gress T, Suttorp N, Drenckhahn D.** Role of actin and myosin in the control of paracellular permeability in pig, rat and human vascular endothelium. *J Physiol* 1990 Dec;431:379-401.
91. **Scott EM, Greenwood JP, Vacca G, Stoker JB, Gilbey SG, Mary DA.** Carbohydrate ingestion, with transient endogenous insulinaemia, produces both sympathetic activation and vasodilatation in normal humans. *Clin Sci (Lond)* 2002 May;102:523-529.
92. **Shea SM, Karnovsky MJ, Bossert WH.** Vesicle transport across endothelium, simulation of a diffusion model. *J Theor Biol* 1969 Jul;24:30-42.
93. **Sheldon R, Moy A, Lindsley K, Shasby S, Shasby DM.** Role of myosin light-chain phosphorylation in endothelial cell retraction. *Am. J. Physiol* 1993 Dec;265(6 PT 1),606-612.
94. **Simionescu M, Gafencu A, Antohe F.** Transcytosis of plasma macromolecules in endothelial cells: a cell biological survey. *Microsc Res Tech* 2002 Jun 1;57:269-288.
95. **Simionescu M, Simionescu N.** The ultrastructure of microvascular wall. Functional correlation. In: Handbook of Pathobiology. The microcirculation. EM Renkin, CC Michel (eds.), *American Physiological Society, Bethesda*. 1982;30-51.
96. **Sodi-Pallares D, Testelli M, Fishelder F.** Effects of an intravenous infusion of a potassium-insulin-glucose solution on the electrocardiographic signs of myocardial infarction. A preliminary clinical report. *Am J Cardiol* 1962 Feb;9:166-81.

97. **Spahr R, Piper HM.** Microcarrier cultures of endothelial cells. In: *Cell Culture Techniques in Heart and Vessel Research.*, edited by H.M. Piper. Heidelberg: Springer-Verlag 1990;S.220-229.
98. **Sumpio BE, Riley JT, Dardik A.** Cells in focus: endothelial cell. *Int J Biochem Cell Biol* 2002 Dec;34:1508-1512.
99. **Sundell J, Laine H, Luotolahti M, Kalliokoski K, Raitakari O, Nuutila P, Knuuti J.** Obesity affects myocardial vasoreactivity and coronary flow response to insulin. *Obes Res* 2002 Jul;10(7):617-24.
100. **Toborek M, Kaiser S.** Endothelial cell functions. Relationship to atherogenesis. *Basic Res Cardiol* 1999 Oct;94(5):295-314.
101. **Van den Berghe G, Wilmer A, Hermans G, Meersseman W, Wouters PJ, Milants I, Van Wijngaerden E, Bobbaers H., Bouillon R.** Intensive Insulin Therapy in the Medical ICU. *N Engl J Med* 2006 Feb 2;354:449-61.
102. **Van Hinsbergh VWM.** Endothelial Permeability for Macromolecules. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997 Jun;17(6):1018-1023.
103. **Vandenbroucke E, Mehta D, Minshall R, Malik AB.** Regulation of endothelial junctional permeability. *Ann N Y Acad Sci* 2008 Mar;1123:134-45.
104. **Vanhaesebroeck B, Alessi DR.** The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem J* 2000 Mar 15;346 (Pt 3):561-576.
105. **Vanhaesebroeck B, Waterfield MD.** Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases. *Exp Cell Res* 1999 Nov 25;253(1):239-54.
106. **Verin AD, Gilbert-McClain LI, Patterson CE, Garcia JG.** Biochemical regulation of the nonmuscle myosin light chain kinase isoform in bovine endothelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998 Nov;19(5):767-76.
107. **Verin AD, Patterson CE, Day MA, Garcia JG.** Regulation of endothelial cell gap formation and barrier function by myosin-associated phosphatase activities. *Am. J. Physiol* 1995 Jul;269(1 Pt 1):99-108.
108. **Vincent MA, Clerk LH, Lindner JR, Price WJ, Jahn LA, Leong-Poi H, Barrett EJ.** Mixed meal and light exercise each recruit muscle capillaries in healthy humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006 Jun;290:1191-1197.
109. **Vita JA, Treasure CB, Nabel EG, McLenachan JM, Fish RD, Yeung AC, Vekshtein VI, Selwyn AP, Ganz P.** Coronary vasomotor response to acetylcholine relates to risk factors for coronary artery disease. *Circulation* 1990 Feb;81(2):491-7.

110. **Waschke J, Curry FE, Adamson RH, Drenckhahn D.** Regulation of actin dynamics is critical for endothelial barrier functions. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005 Mar;288(3):1296-1305.
111. **Wilcox JN, Subramanian RR, Sundell CL, Tracey WR, Pollock JS, Harrison DG, Marsden PA.** Expression of Multiple Isoforms of Nitric Oxide Synthase in Normal and Atherosclerotic Vessels. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 1997 Nov;17:2479-2488.
112. **Wojciak-Stothard B, Potempa S, Eichholtz T, Ridley AJ.** Rho and Rac but not Cdc42 regulate endothelial cell permeability. *J Cell Sci* 2001 Apr;114:1343-55.
113. **Wojciak-Stothard B, Ridley AJ.** Rho GTPases and the regulation of endothelial permeability. *Vascul Pharmacol* 2002 Nov;39 (4-5):187-199.
114. **Wojciak-Stothard B, Tsang LY, Haworth SG.** Rac and Rho play opposing roles in the regulation of hypoxia/reoxygenation-induced permeability changes in pulmonary artery endothelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005 Apr;288(4):749-760.
115. **Wojciak-Stothard B, Tsang LY, Paleolog E, Hall SM, Haworth SG.** Rac1 and RhoA as regulators of endothelial phenotype and barrier function in hypoxia-induced neonatal pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006 Jun;290(6):1173-1182.
116. **Wysolmerski RB, Lagunoff D.** Involvement of myosin light-chain kinase in endothelial cell retraction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990 Jan;87(1):16-20.
117. **Zeng G, Nystrom FH, Ravichandran LV, Cong LN, Kirby M, Mostowski H, Quon MJ.** Roles for insulin receptor, PI3-kinase, and Akt in insulin-signaling pathways related to production of nitric oxide in human vascular endothelial cells. *Circulation* 2000 Apr 4;101(13):1539-1545.
118. **Zeng G, Quon MJ.** Insulin-stimulated production of nitric oxide is inhibited by wortmannin. Direct measurement in vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 1996 Aug 15;98(4):894-898.

10. Anhang

Veröffentlichungen

1. „Insulin stabilizes microvascular endothelial barrier function via PI3K/Akt mediated Rac1 activation.“ D. Gündüz, **J. Thom**, I. Hussain, FV. Härtel, A. Erdogan, M. Grebe, DG. Sedding, HM. Piper, HH. Tillmanns, T. Noll and M. Aslam. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010 Mar 25.

Abstracts/ Kongressbeiträge

- „Insulin-stimulierte Thrombozyten stabilisieren die endotheliale Schrankenfunktion.“ D. Gündüz, **J. Thom**, M. Aslam, I. Hussein, FV. Härtel, M. Grebe, R. Voss, DG. Sedding, T. Noll, HH. Tillmanns. 75. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Mannheim, 2009.
- „Insulin stabilisiert die mikrovaskuläre, koronarendotheliale Schrankenfunktion über Aktivierung des PI3-Kinase/Akt/NOS-Signalweges.“ D. Gündüz, **J. Thom**, M. Aslam, I. Hussein, FV. Härtel, M. Parahuleva, DG. Sedding, I. Fleming, T. Noll, HH. Tillmanns. 75. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Mannheim, 2009.
- „Insulin stabilizes coronary microvascular endothelial barrier function via PI3K/Rac1-mediated stabilization of cell-cell adhesions.“ M. Aslam, **J. Thom**, I. Hussain, FV. Haertel, M. Parahuleva, M. Grebe, A. Erdogan, T. Noll, HH. Tillmanns, D. Guenduez. ESC Congress, Barcelona, 2009.
- „Insulin induces the release of endothelial barrier stabilizing factor from platelets via PI3K/Akt-Nitric Oxide pathway.“ D. Guenduez, **J. Thom**, M.

Aslam, I. Hussain, FV. Haertel, M. Grebe, A. Erdogan, DG. Sedding, T. Noll, HH. Tillmanns. ESC Congress, Barcelona, 2009.

- „Insulin Stabilizes Coronary Microvascular Endothelial Barrier via PI3K/Rac1-mediated Stabilization of cell-cell adhesions.” M. Aslam, **J. Thom**, I. Hussain, FV. Haertel, M. Grebe, A. Erdogan, HM. Piper, HH. Tillmanns, T. Noll, D. Guenduez. Annual Meeting of the American Heart Association, Orlando, 2009.

Danksagung

Ich möchte Herrn **Prof. Dr. Tillmanns** für die Bereitstellung des Themas und des Arbeitsplatzes, für die engagierte fachliche Beratung und Unterstützung sowie für sein stetes Interesse am erfolgreichen Fortgang dieser Arbeit danken.

Sehr herzlich möchte ich Herrn **Dr. Dursun Gündüz** für eine sehr gute Betreuung und seine ständige Diskussionsbereitschaft danken. Er hat mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite gestanden und viel zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Allen Mitarbeitern des Angiologischen und Physiologischen Instituts möchte ich für ihre stete Aufgeschlossenheit und Hilfsbereitschaft danken. Insbesondere danke ich **Sabine Schäfer, Daniela Reitz, Henrike Thomas, Gudrun Albohn, Dr. Frauke Härtel und Dr. Muhammad Aslam**, die mir nicht nur bei der Durchführung der Versuche mit Rat und Tat zur Seite standen.

Auch **meiner Familie** möchte ich für ihr Verständnis und die langjährige Unterstützung danken.

Erklärung:

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

(Johannes Stefan Thom)

edition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5638-4



© Sebastian Kaulitzki - Fotolia.com